



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS/UFPE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO*
DE ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DE *Schistosoma mansoni*
FRENTE A β -LAPACHONA**

**RECIFE – PE
2013**

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências da saúde
Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical

**Susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* de estágios evolutivos de
Schistosoma mansoni frente a β -lapachona**

ANDRÉ DE LIMA AIRES

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Medicina Tropical da Universidade Federal de
Pernambuco, como parte do requisito para obtenção de
grau de Doutor na linha de pesquisa em **Doenças
Parasitárias**.

Orientadores: Dr^a Valdênia Maria Oliveira Souza

Dr^a Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

RECIFE – PE
2013

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa - CRB4-1010

A298s Aires, André de Lima.
Susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* de estágios evolutivos de *Schistosoma mansoni* frente a β -lapachona / André de Lima Aires. – Recife: O autor, 2013.
156 f. : il. tab.; quad.; graf.; 30 cm.

Orientadora: Valdênia Maria Oliveira de Souza.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS.
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2013.
Inclui bibliografia e anexos.

1. Tabebuia. 2. Ultraestrutura. 3. In vitro. 4. Murino. 5. *Schistosoma mansoni*. I. Souza, Valdênia Maria Oliveira de. (Orientadora). II. Título.

618.9883

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2013-012)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – CCS/UFPE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

REITOR

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Sílvio Romero Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Francisco de Sousa Ramos

DIRETOR CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Nicodemos Teles de Pontes Filho

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

COORDENADORA

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

VICE-COORDENADORA

Valdênia Maria Oliveira Souza

CORPO DOCENTE

Ana Catarina de Souza Lopes

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Celina Maria Turchi Martelli

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André Brayner dos Santos

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria do Amparo Andrade

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães da Silveira

Vlaudia Maria Assis Costa



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA TESE DO DOUTORANDO

ANDRÉ DE LIMA AIRES

No dia 08 de fevereiro de 2013, às 08h00, na Sala de Aula do Depto. de Enfermagem do CCS/UFPE, 1º. and. do Hospital das Clínicas, os Membros Doutores a Profª. Drª. ANA LÚCIA COUTINHO DOMINGUES – Presidente da Banca (UFPE), a Profª. Drª. VLAUDIA MARIA ASSIS COSTA (UFPE), o Profº. Drº. JEYMESSON RAPHAEL CARDOSO VIEIRA (UFPE), a Profª. Drª KEDMA DE MAGALHÃES LIMA (FACULDADE ESTÁCIO-RECIFE) e a Profª. Drª JULIANA KELLE DE ANDRADE LEMOINE NEVES (CPq/AM-FIOCRUZ), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram o doutorando **ANDRÉ DE LIMA AIRES** sobre a sua Tese intitulada “SUSCEPTIBILIDADE *in vitro* E *in vivo* DE ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DE *Schistosoma mansoni* FRENTE A β -LAPACHONA”, o qual foi orientado pela Profª. Drª. Valdênia Maria Oliveira de Souza (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do doutorando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profª. Drª. Ana Lúcia Coutinho Domingues

APROVADO

Profª. Drª. Vlaudia Maria Assis Costa

APROVADO

Profº. Drº. Jeymesson Raphael Cardoso Vieira

APROVADO

Profª. Drª Kedma de Magalhães Lima

APROVADO

Profª. Drª. Juliana Kelle de Andrade Lemoine Neves

APROVADO



*O que sempre foi consequência,
Um dia tornou-se sonho,
Ontem foi objetivo
E hoje é realidade.*

André Aires

O AMOR é o mais forte dos PARASITAS

Amor: Agente etiológico da infecção crônica parasitária mais antiga da história da humanidade.

Parasita causador da felicidade egocêntrica.

Parasitose repleta de felicidade egoísta, atenção, respeito, admiração, carinho, amizade, afeto.....

Seus hospedeiros - seres frágeis e emotivos.

Resposta imune inata - não existe.

Adaptativa - só leva ao imenso vazio e solidão.

A transmissão pode ocorrer por via respiratória, via ocular, via oral.

A via direta é considerada por diversos estudiosos, da área, como sendo a mais perigosa das vias. Neste caso a infecção é AGUDA e seus hospedeiros são ASSINTOMÁTICOS. Os sinais e sintomas clínicos são inespecíficos - a parasitose não é estabelecida e regride rapidamente sem tratamento específico.

O olhar é a via de transmissão que tem o menor período de incubação e por muitos considerada a via que leva a cronicidade. Como resultado ELE encista-se na musculatura cardíaca, tornando-se resistente a todos os agentes externos que comprometam seu estabelecimento.

Não existem drogas profiláticas.

Não existe vacina.

Uma vez contaminado - jamais curado.

A reinfecção é a causa mais comum das tolerâncias e resistências.

Pacientes com hipersensibilidade ou estado imunológico comprometido são os que apresentam sequelas cardiológicas e neurológicas mais agressivas.

O AMOR é o mais forte dos PARASITAS

Quando em mutualismos, os seus hospedeiros evoluem para um estado de ANINHADOS, OBESOS, CABELOS BRANCOS ...

MAS FELIZES.

André Aires



DEDICATÓRIA

“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é de alguém que acredite que ele possa ser realizado”.

Roberto Shinyashiki

DEDICATÓRIA

A DEUS, por sempre ter colocado pessoas especiais no meu caminho que me possibilitou conhecer a verdadeira intimidade do que é estar ao lado DELE.

A minha amada mãe, Alcione de Lima, que me ensinou a importância do respeito e ter suportado a minha ausência. Na chuva ou no sol ... lá estava ela com um balde e uma toalha nas mãos srsrsrs. Lembro-me bem dos dias que me dizia: ``Meu filho Deus tem o melhor pra você``. Sua luta nunca será esquecida.

Ao meu pai, Antônio Tadeu Aires, minha referência em integridade pessoal e profissional. Homem de coração novo, novinhoooo Agradeço a Deus por cada vez compreendê-lo melhor.

À Maria das Graças que tolera a minha chata presença diariamente.

A vocês sou-lhes eternamente agradecido.

Aos meus irmãos, Alcilene Aires e Alberto Aires, motivos de muito orgulho.

Aos meus irmãos, Eduardo e Suely, que sempre me apoiaram em muitos momentos difíceis.

A todos os outros de minha família que sinceramente torceram pelo meu sucesso.

Amo-os incondicionalmente!



AGRADECIMENTO

*“Aprendi com a esperança,
Que não devemos ser donos de nossos sonhos,
Pois eles devem ser livres, sempre.”*

George Nascimento

AGRADECIMENTOS

Gostaria de sinceramente agradecer a todos que direta ou indiretamente puderam contribuir não só com o desenvolvimento deste trabalho, como, principalmente, com o meu amadurecimento pessoal e profissional.

Agradeço imensamente a prof^a Dr^a Marília Cavalcanti, o primeiro chute foi seu e disso nunca esquecerei, MINHA AMIGA.

À Prof^a. Dr^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza por ter aceitado a orientação e confiança depositada neste trabalho.

Eternamente agradecido a Prof^a Dr^a Mônica Albuquerque pela amizade, atenção, cuidado, apoio profissional e pessoal e todo o ensinamento transmitido nesses anos. A senhora é a grande RESPONSÁVEL ao meu imenso desejo pela Parasitologia Humana.

A todos do Laboratório de Imunologia do LIKA pelo constante apoio, especialmente à Prof^a. Dr^a. Vláudia Costa e Prof^a. Dr^a. Elizabeth Malagueño.

Ao Prof^a Dr^a Alexandre Góes por ter sintetizado e cedido à droga para teste.

À coordenação, professores, alunos e todos que formam a Pós-Graduação em Medicina Tropical da UFPE.

À Dr^a. Constança Barbosa pelo caráter profissional que representa na minha formação, por ter aberto as portas de seu laboratório e assim ter me feito ganhar além de muito conhecimento, **AMIGOS** que levo sempre na memória.

À Alamisne gomes, Anderson Felipe, Joicy Kelly e Juliana pela desprendida e importante ajuda durante a conturbada administração das drogas e por terem atenuado minhas crises de surtos. Obrigado pelo apoio!

À nossa veterinária Dr^a Maria Helena e todos competentes profissionais do Biotério do LIKA.

Já dizia Aristóteles - “ *quem tem muitos amigos, acaba não tendo amigo nenhum* ”

Às amigas Ana Patrícia, Sara, Nilza, Juliana e Talita e a todas que juntas formam o Círculo de Oração. Obrigado pelas orações e por levar meus pedidos ao mais alto dos céus.

À minha AMIGA Prof^a. Dr^a. Marilene da Silva – *MARLENE* e amigos do Laboratório de Fungos Aquáticos da UFPE pela agradável companhia e amizade que construímos.

À Ana Paula, Aline de Paula, André Ricardo, Carlos Alberto e Renata Maria. Cara por isso que tu é assssimmmm Agradável companhia.

À Bruno Galvão, Danielly Cantarelli e Kedma Magalhães pelo constante apoio, confiança no meu trabalho e profunda paciência comigo.

À Fabiana Letícia, Daniela Aquino e Bruno Galvão pela excelente conquista de ter conhecido e compartilhado ótimos momentos com vocês. Janeiro e fevereiro de 2011 são inesquecíveis, depois desta época sou outra pessoa.

Aos amigos Bruno Galvão, Marcos de Paula, Alexandre Izambard, Wallace Nascimento, Salatiel Junior e Rogério Silva. Com essa equipe diversão, alegria e excelente papo são garantidos.

À Fernanda Francisca e Emily, amigas incondicionais que sempre me impulsionaram em todos os meus momentos.

A TODOS da Turma “**Biologia: Arte e Ciências pela Vida**” pelo orgulho e o diferencial que juntos construímos.

A melhor coordenadora do Brasil, Kátia Cesar, obrigado pela confiança e apoio. As amigas Fabiana Licia, Catarina Gadelha e Glívia Barros. A todos os professores “conceito 4”. Sentirei muita saudade de tudo ... até do que reclamava.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (FACEPE), pela concessão da bolsa de estudo.

E a todos os outros amigos que sempre recordam de mim com carinho, que me admiram e torcem pelo meu sucesso.

ÍNDICE

LISTAS DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS	13
RESUMO	16
ABSTRACT	18
1. DEFINIÇÃO DO OBJETO DE PESQUISA	19
2. REVISÃO DA LITERATURA	21
3. HIPÓTESE E MODELO TEÓRICO	62
4. DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS	63
5. OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA	64
6. ARTIGOS	72
Artigo 1 - Análise ultraestrutural dos danos induzidos pela β-Lapachona na superfície da membrana de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> cepa BH	71
Resumo	72
Introdução	72
Matérias e métodos	75
Resultados	77
Discussão	82
Referências	87
Artigo 2 - β-Lapachona (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b] pyran-5,6-dione) contra diferentes estágios do <i>Schistosoma mansoni</i> em camundongos	115
Highlights	115
Graphical abstract	115
Resumo	116
Introdução	116
Matérias e métodos	118
Resultados	120
Discussão	124
Referências	128
CONCLUSÕES	155
ANEXO	156

LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Distribuição da esquistossomose de acordo com seus agentes etiológicos.	22
Figura 2. Ovos de <i>Schistosoma</i> com importância em saúde pública humana.	24
Figura 3. Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários de <i>S. mansoni</i> .	26
Figura 4. Distribuição da esquistossomose mansoni no Brasil.	27
Figura 5. Prevalência de esquistossomose mansoni nos municípios da Zona da Mata de Pernambuco, de acordo com estudo feito em escolares.	28
Figura 6. Formas evolutivas do <i>S. mansoni</i> .	30
Figura 7. Ciclo Biológico do <i>Schistosoma mansoni</i> .	32
Figura 8. Estrutura química do praziquantel	37
Figura 9. Estrutura química da β -Lapachona.	40
Figura 10. Ipês roxo e branco.	41
Figura 11. Esquema simplificado da síntese da β -lapachona a partir do lapachol por catálise ácida.	42
Figura 12. Microscopia óptica dos cristais de β -lapachona.	42
Quadro 1. Distribuição das espécies de <i>Schistosoma</i> de acordo com as características morfológicas do ovo, malacológicas, distribuição geográfica e habitat dos vermes adultos.	23

OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

Figura 1. Esquema de cultura, de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> , em meio RPMI.	65
Figura 2. Esquema da formação dos grupos experimentais.	67

ARTIGO I

Figura 1. Estrutura química da β -lapachona	73
Figura 2. a-c Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tegumento dos vermes adultos machos <i>S. mansoni</i> do grupo controle negativo. Parasitos incubados em meio de manutenção por 18 h; (a, $\times 140$) mostrando canal ginecóforo (GC), (b, $\times 500$) porção anterior mostrando ventosa oral ou acetábulo (OS) e ventosa ventral (VS), (c, $\times 2000$), região dorsal onde tubérculos (T), papilas ciliadas (CP), papilas em forma de cúpula (DP) e dobras tegumentares paralelas (TF) são visíveis.	78
Figura 3. imagens de MEV de vermes adultos machos de <i>S. mansoni</i> exposto a $50 \mu\text{M}$ de β -lap. Em 3h (a, $\times 130$) mostra curvatura dorsoventral (b, $\times 500$) vista ampliada de a mostrando região anterior com bolhas e lesão focal (FL) no tegumento; (c, $\times 2000$) superfície dorsal mostrando algumas pequenas bolhas como uma massa (B); em 6 h (d, $\times 133$) vermes dorsoventralmente encurvado como em a; (e, $\times 800$) vista ampliada da porção anterior de d mostrando a erosão do tegumento (TE) em torno da ventosa oral; (f,	80

x2000) lesões do tegumento dorsal lateral, mostrando a erosão de tubérculos; em 18 h (g, x130) mostra verme com maior curvatura dorsoventral do que em a e d; (h, x1000), parte anterior do tegumento edemaciado, profundas dobras coalescidas (PC) áreas com rachaduras (C) e formação de bolhas (B), (i, x2000) tegumento com erosão de tubérculos e perda de espículas.

Figura 4. imagens de MEV de vermes adultos machos de *S. mansoni* exposto a 100 μ M de β -lap. (a, x187) (d, x170) (g, x190) os vermes curvam-se para formar, em g, uma forma em espiral. Em 3 h (a, x 187), o verme enrolado dorsoventralmente, (b, x500) vista ampliada de uma porção anterior do tegumento mostrando edema e lesão focal (FL), (c, x2000) tubérculos danificados, com perda de espículas e exposição do tecido subtegumental; em 6 h (d, x170) verme exibindo contração mais intensa do que em a; (e, x600) vista ampliada de d mostrando contração da porção anterior (*), tegumento edemaciado, presença de sulcos (S) e danos na parte lateral dorsal do tegumento; (f, x 2000) visão ampliada de e mostrando camada subtegumental e presença de bolhas; (h, x500) visão ampliada da porção anterior de g severamente contraída com tegumento inchado mostrando sulcos; (i, x2000) vista ampliada de h mostrando tegumento dorsal lateral com presença de várias bolhas (B) e uma área com evidente protuberância (P).

81

Figura 5. imagens de MEV de vermes adultos machos de *S. mansoni* expostos a 10 μ M de PZQ. Em 3 h (a, x190) mostrando verme severamente contraído e encurtado; em 6 h (b, x 2000) tubérculos com perda de espículas e aparecimento de erosões no tegumento; (c, x2000) bolhas sobre a superfície do tegumento com tubérculos justapostos.

82

Tabela 1. Scores para controle de motilidade de vermes tratados com praziquantel (PZQ) e β -lapachona (β -lap) em diferentes horas pós-incubação.

77

ARTIGO II

Figura 1. Estrutura química da β -lapachona

117

Figura. 2. Efeito do tratamento *in vivo* de beta-lapachona sobre o padrão de oviposição de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

121

Figura 3. Secções histológicas e diâmetro médio de granuloma hepático periovular de camundongos infectados com *S. mansoni*. A imagem a representa granuloma dos animais não expostos ao tratamento com β -lap (controles), exibindo intenso infiltrado de eosinófilos, neutrófilos, além de poucos macrófagos e linfócitos circundando o ovo central em degeneração. Imagem b granuloma em maior aumento de a. Imagem c, granuloma de animais tratado com β -lap, aos 45° dia de infecção, circundado por feixes de fibra de colágeno, fibroblastos e poucas células inflamatórias. Imagem d média do diâmetro de gramulomas de animais tratados com β -lap, aos 45° dia de infecção (p<0.001).

123

Tabela 1 Efeitos da beta-lapachona (50mg/kg/dia, durante 5 dias consecutivos) na carga de vermes, ovos e número médio dos granulomas no tecido hepático de camundongos albergando diferentes estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*, perfundidos 60 dias após a infecção.

122



RESUMO

RESUMO

Uma a cada trinta pessoas é portadora de esquistossomose ao redor do mundo. Atualmente, o praziquantel (PZQ) é o único medicamento recomendado para o tratamento e controle da esquistossomose. Embora seguro e eficaz, é preocupante disponibilizar apenas uma droga para o tratamento de uma doença que afeta milhões de pessoas. Além disso, o PZQ apresenta baixa atividade contra esquistossômulos, vermes jovens e vermes fêmeas adultas e diversos estudos alertam para uma possível seleção de cepas *Schistosoma*-resistentes e/ou tolerantes a esse fármaco. Isso nos encoraja a contribuir com novos estudos para preservar o PZQ. Inicialmente desenvolvida como droga anti-tumoral, β -lapachona (β -lap), orto-naftoquinona lipofílica de ocorrência natural, análogo semi-sintético do lapachol, tem recebido muita atenção da comunidade científica devido a sua ampla atividade biológica. As naftoquinonas, incluindo β -Lap, têm se mostrado ativas contra o *S. mansoni* bloqueando a penetração cercariana quando aplicados topicamente e também atuando como cercaricida; inibindo a glicólise aeróbica de vermes adultos; alterando a motilidade e superfície do tegumento dos vermes e atuando como moluscicida contra adulto e massas de ovos de *Biomphalaria glabrata*. O presente estudo fornece, pela primeira vez, conclusões sobre as propriedades esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* de β -lap. Nos ensaios *in vitro* a mortalidade, motilidade e alterações no tegumento observadas por microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas como parâmetros esquistossomicida. Em modelo murino avaliamos os efeitos esquistossomicida da β -lap sobre esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens e vermes adultos. *In vitro* a morte do parasito foi precedida por progressivo dano na superfície da membrana, caracterizado por descamação do tegumento, redução dos espículos, formação de bolhas, ruptura e aparecimento de erosão na superfície tegumentar. Além disso, intenso edema generalizado, áreas de rachaduras com superfície rugosa, sulcos e aparente fibrose, também foram visualizadas na porção anterior do verme. O número de parasitos mortos foi concentração e tempo dependentes. β -Lap reduziu significativamente ($p < 0,001$) a carga parasitária total em 29,78%, 37,2%, 24,2% e 40,22%, quando administrado *in vivo* durante as fases de esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens e vermes adultos, respectivamente. Redução significativa também foi alcançada na carga de vermes fêmeas para os mesmos esquemas terapêuticos. Em todos os grupos, houve redução significativa no número de ovos e granulomas no tecido hepático. A intervenção, realizada durante a fase de vermes adultos, reduz o tamanho dos granulomas hepático e percentual de ovos imaturos, além de aumentar a porcentagem de ovos maduros e mortos. O emprego de novas formulações contendo β -lap abrem perspectivas de novos estudos que visem aumentar sua atividade e elucidar seu mecanismo de ação, além de utilizá-la como protótipo para a síntese de novos derivados naftoquinônicos com potencial esquistossomicida.

PALAVRAS-CHAVES: *Tabebuia* Ultraestrutura, *in vitro*, murino, *Schistosoma mansoni*



ABSTRACT

ABSTRACT

One in thirty people is carrying schistosomiasis around the world. Currently, praziquantel (PZQ) is the only drug recommended for the treatment and control of schistosomiasis. Although safe and effective, it is worrying to provide only one drug to treat a disease that affects millions of people. In addition, PZQ presents poor activity against schistosomula, young worms and adult female worms and several studies warn for a possible selection of *Schistosoma*-resistant and/or tolerant strains to this drug. This encourages us to contribute with new studies to preserve the PZQ. Initially developed as anti-tumor drug, β -lapachone (β -lap), an ortho-naphthoquinone lipophilic of natural occurrence, semi-synthetic analog of lapachol, has received much attention from the scientific community due to its wide biological activity. The naphthoquinones, including β -Lap, have shown activities against *S. mansoni* blocking the cercarial penetration when applied topically and also acting as cercaricida; inhibit aerobic glycolysis of adult worms; alter motility and the surface of the tegument of worms and act as molluscicide against adult snail and egg masses of *Biomphalaria glabrata*. The present study provides, for the first time, conclusions about the properties schistosomicidal *in vitro* and *in vivo* of β -lap. *In vitro*, the mortality, motility and changes in the tegument observed by scanning electronic microscopy were used as parameters schistosomicidal. In murine model, we evaluated the schistosomicidal effects of β -lap on skin schistosomula, lung schistosomula, young worms and adult worms. *In vitro*, the parasite death was preceded by progressive damage on the membrane surface, characterized by flaking of the tegument, reduction of spicules, blistering, breaking and appearance of erosion on the tegument surface. Moreover, intense generalized edema, areas with rough surface cracks, grooves and apparent fibrosis, were also detected in the anterior portion of the worm. The number of dead parasites was concentration and time dependent. β -Lap significantly reduced ($p < 0.001$) the total parasite load to 29.78%, 37.2%, 24.2% and 40.22%, when administered *in vivo* during phases of skin schistosomula, lung schistosomula, young worms and adult worms, respectively. Significant reduction was also achieved in female worm burden for the same treatment. In all groups, there was significant reduction in the number of eggs and granulomas in liver tissue. The intervention, conducted during the adult worms phase, reduces the size of hepatic granulomas and the percentage of immature eggs, and also increases the percentage of mature and dead eggs. The use of new formulations containing β -lap opens perspectives for new studies aiming the increasing of its activity and to elucidate its mechanism of action, and also use it as a prototype for the synthesis of new naftoquinônicos derivatives with schistosomicidal potential.

KEYWORDS: β -lapachone, tegument changes, ultrastructure, murine model, evolutionary stages of *S. mansoni*



DEFINIÇÃO DO OBJETO DE PESQUISA

1. DEFINIÇÃO DO OBJETO DE PESQUISA

1.1 DELIMITAÇÃO DO TEMA

A esquistossomose, é uma doença crônica e debilitante causada por vermes do gênero *Schistosoma*. Estima-se em 779 milhões de pessoas sobre risco permanente de infecção, 207 milhões infectadas, das quais 20 milhões apresentam complicações crônicas e mais de 500.000 morrem todos os anos (STEINMANN et al, 2006; WHO, 2008).

Apesar de muitos esforços, a esquistossomose ainda é uma doença negligenciada. Na inexistência de vacina satisfatória e ações eficazes em saúde pública a quimioterapia é o único recurso imediato para reduzir a prevalência e incidência da esquistossomose (CIOLI, PICA-MATTOCCIA, ARCHER 1995). Atualmente o praziquantel (PZQ) é droga de escolha por ser efetiva contra todas as espécies de *Schistosoma* que infectam o homem. Que, apesar de seguro e eficaz, é preocupante a disponibilidade de apenas uma droga empregada no tratamento de uma doença que afeta milhões de pessoas. Além disto, o PZQ apresenta baixa atividade contra esquistossômulos, verme jovem e fêmea (GRYSSELS et al., 2001; PICA-MATTOCCIA, CIOLI, 2004) e diversos estudos alertam possível seleção de cepas *Schistosoma*-resistentes e/ou tolerantes ao PZQ. Este quadro, não apenas justifica, mas aponta a necessidade de planejamento, desenvolvimento e pesquisas com novos fármacos com potencial esquistossomicida *in vivo* e *in vitro* (CIOLI, 2000).

β -Lapachona (β -lap) (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] pirano-5,6-diona) é uma orto-naftoquinona lipofílica de ocorrência natural, análogo semi-sintético do lapachol, quinona extraída da casca de árvores das famílias Bigoniaceae e Verbenaceae, encontradas em muitas regiões do Brasil, país onde seu extrato é amplamente empregado na medicina popular no controle de diversas enfermidades (PINTO et al., 1977). β -lap apresenta propriedades anti-*Trypanosoma cruzi* (MENNA-BARRETO 2007, SALAS et al. 2008), antimaláricas *in vitro* e *in vivo* contra cepas que são sensíveis e resistentes à cloroquina (ANDRADE-NETO 2004; PÉREZ-SACAU et al., 2005), antifúngicas (MEDEIROS et al., 2010), antibacteriana (KENNETH et al. 2012), inibindo a replicação do vírus HIV-1, da transcriptase reversa do vírus da mieloblastose aviária, leucemia murina Rauscher e do α -polimerase de DNA (SCHUERCH e WEHRLI 1978; LI et al., 1993). No entanto, não há dúvidas que suas propriedades antineoplásicas geram as maiores expectativas na sua molécula. *In vitro* e *in vivo*, β -lap inibi o

crescimento de tumores resistentes à terapia convencionais, particularmente os de proliferação de ciclo celular lento (PARK et al., 2005; SUZUKI et al., 2006; MOON et al., 2010).

β -lap depois de sofrer redução enzimática *in situ* (redox ciclo) produz espécies reativas de oxigênio, que acelera hipóxia intracelular em tumores e microrganismos através da produção de ânion superóxido, aumento peroxidação lipídica e desorganização protéica (MELISSA et al., 2007; PINTO e CASTRO 2009; BEY 2007; SALAS et al., 2008). Com relação às propriedades anti-*Schistosoma* das naftoquinonas, Pinto e colaboradores em (1997) sintetizaram alguns derivados, incluindo a β -Lap, com o objetivo de inibir topicamente a penetração de cercárias do *S. mansoni* em camundongos. Neste experimento, dos 23 derivados, 15 bloquearam a penetração quando aplicado na cauda dos camundongos 24 horas antes da exposição à infecção via caudal (PINTO et al., 1997). Recentemente Lorsuwannarat e colaboradores (2013) demonstraram que 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona, conhecido como plumbagin, é eficaz contra vermes adultos de *S. mansoni*, alterando a motilidade e superfície do tegumento que causariam a morte dos vermes. Outros estudos envolvendo o controle da esquistossomose usando derivados naphthoquinonas incluem a inibição da glicólise aeróbica em adultos de *S. mansoni* (EDINGL, TERSAN e WAITE 1947), atividade moluscicida contra o caramujo adulto e massas de ovos de caramujos *Biomphalaria glabrata* (hospedeiros intermediários de *S. mansoni*) e atividade contra cercárias (cercárias de *S. mansoni*) (LIMA et al., 2002; CAMARA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009).

Diante do exposto e considerando as propriedades farmacológicas da β -lap, torna-se necessária uma investigação direcionada a sua análise sobre o *S. mansoni*, empregando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* e aplicando uma abordagem mais ampla dos aspectos parasitológicos antes ainda não estudados. Dessa forma, pretendemos contribuir para o conhecimento de uma droga com potencial esquistossomicida, cuja infecção representa um grave problema de saúde pública mundial.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Epidemiologia e distribuição geográfica da esquistossomose

Enquanto a maioria das doenças parasitárias vai diminuindo em importância, com função do desenvolvimento econômico e controle disponível, a esquistossomose encontra-se em plena expansão. Em escala global, um a cada trinta indivíduos é portador de esquistossomose, o que representa cerca de 207 milhões de pessoas infectados. Há estimativa que em 78 países e territórios 779 milhões de pessoas encontram-se sobre risco constante de contrair a esquistossomose, e que 20 milhões desenvolvam a forma crônica, evoluindo para sérias complicações, que causam aproximadamente 500.000 mortes anuais (BINA e PRATA, 2003; CHITSULO, LOVERDE, ENGELS, 2004; PARISE FILHO et al., 2007; WHO 2008).

A gravidade que assume a doença em muitos casos e o déficit orgânico que produz, fazem da esquistossomose a segunda mais importante doença tropical em termo de morte e morbidade, ficando atrás apenas da malária. Uma doença é considerada endêmica com base na análise das características espaciais e temporais que definem um determinado agravo à saúde. A esquistossomose é considerada uma endemia, pois acomete ampla faixa de populações sob riscos específicos, há um longo tempo. Os acometidos encontram-se amplamente distribuída em países dos continentes Asiático, Africano e Americano, incluindo neste o Brasil (Figura 1). Em 2005, King e colaboradores referem-se à esquistossomose como uma pandemia, e a responsabiliza por 2-15% do subdesenvolvimento da população portadora da doença (KING et al., 2005).

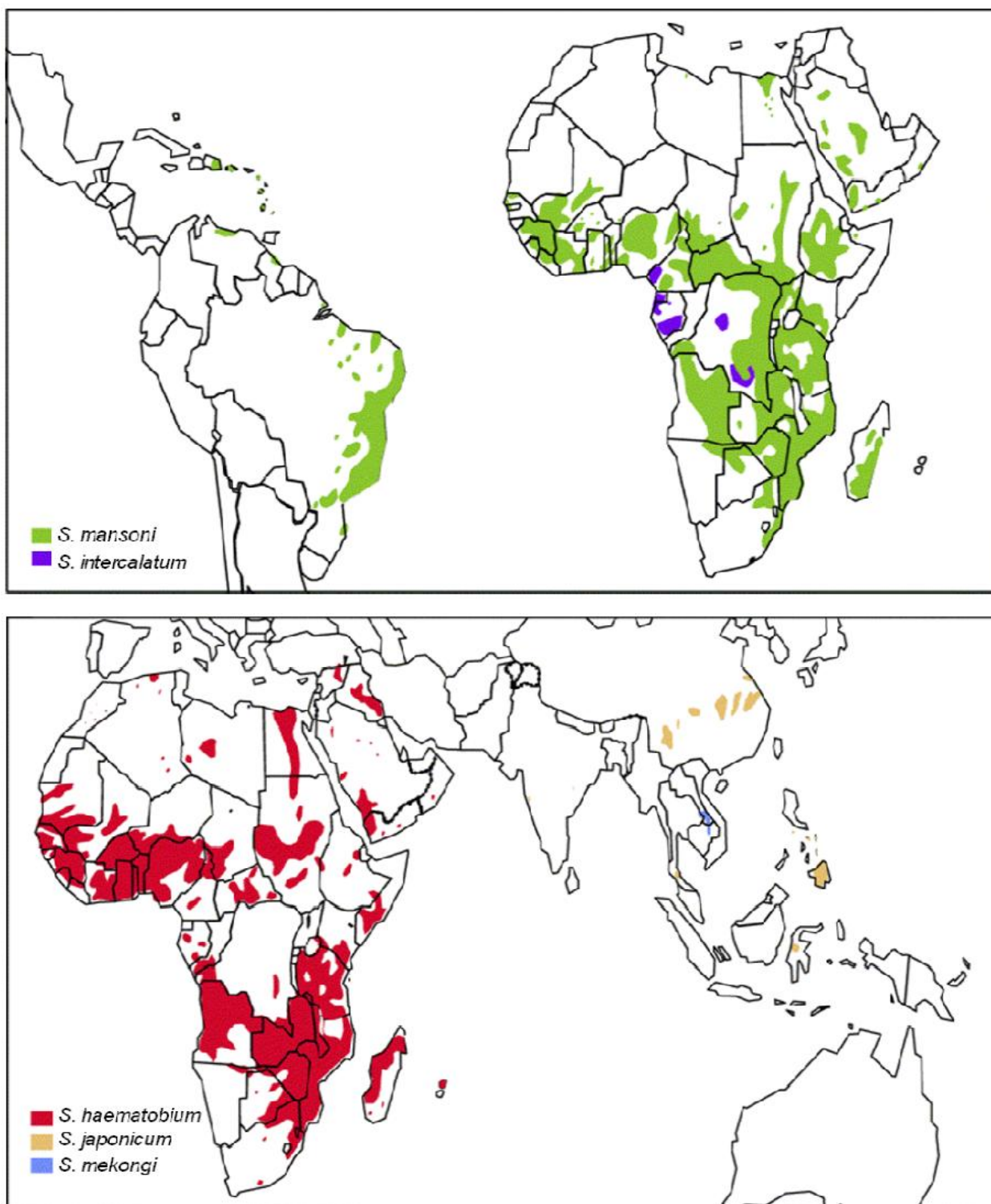


Figura 1. Distribuição global da esquistossomose de acordo com seus agentes etiológicos (WHO 2011).

O gênero *Schistosoma* apresenta cinco espécies responsáveis por problemas de saúde pública na epidemiologia humana. Considerando as características morfológicas do verme, morfologia do ovo, evolução do ciclo biológico, espécies de moluscos hospedeiros, distribuição geográfica e padrões de isoenzimas e DNA, as espécies do gênero *Schistosoma* são assim classificadas (DESPRÈS, IMBERT-ESTABLET, MONNEROT 1993) (Quadro 1 e figura 2).

Quadro 1. Distribuição das espécies de *Schistosoma* de acordo com as características morfológicas do ovo, malacológicas, distribuição geográfica e habitat dos vermes adultos.

Espécie	Morfologia do ovo	Hospedeiro Intermediário	Distribuição Geográfica	Habitat do verme adulto
<i>S. haematobium</i>	Ovos elipsóides com espículo terminal	<i>Bulinus sp</i>	África/ Oriente Médio	Plexo Urinário
<i>S. intercalatum</i>	Ovos elipsóides com esporão terminal	<i>Bulinus sp</i>	África Central	Mesentéricas/ Plexo Urinário
<i>S. japonicum</i>	Ovo ovóide com espículo lateral	<i>Oncomelania sp</i>	China, Japão, Filipinas	Veia Porta/ Mesentéricas
<i>S. mekongi</i>	Ovos ovóide com rudimento de espículo lateral	<i>Neotricula aperta</i>	Sudeste Asiático	Veia Porta/ Mesentéricas
<i>S. mansoni</i>	Ovos com espículo Lateral	<i>Biomphalaria</i>	África, Antilhas, América do Sul e Central	Veia Porta/ Mesentéricas

Espécies do gênero *Schistosoma* importantes em saúde pública

S. Intercalatum

Fischer, 1934



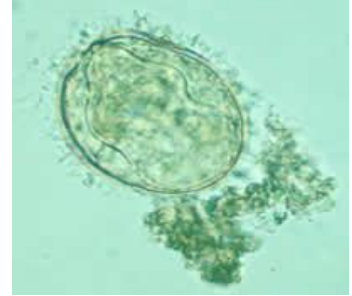
S. japonicum

Katsurada, 1904



S. Mekongi

Voge, Brickner e Bruce, 1978



S. haematobium

Bilhartz, 1852



S. mansoni

Sambon, 1907



Figura 2. Ovos de *Schistosoma* com importância em saúde pública humana.

Estimativas mostram que o maior número de pessoas infectadas esteja no continente Africano, onde poucos esforços têm sido implantados no sentido de controlar a infecção (CHITSULO et al., 2000). A África apresenta baixos índices de esquistossomose mansônica na porção Norte, porém na região do delta do Nilo e no Sul do Saara são concentrados os maiores focos, onde existem 85% de todos os casos de esquistossomose no mundo (WHO, 2006). Na Ásia apenas ocorrem focos na Arábia Saudita, Iêmen e Oman. Na América Central e América do Sul, os locais de infecção estão em vários estados do Brasil, Venezuela, Suriname, Porto Rico, República Dominicana e Antilhas (ROSS et al., 2002).

Embora existam cinco espécies que acometem o homem, o *S. mansoni* é a de maior prevalência, endêmica em 55 países, principalmente no Sul do Saara africano como também em grande parte da América do Sul (CHITSULO, 2000). As espécies do gênero *Schistosoma* provavelmente chegaram às Américas com o tráfico de escravos africanos e com a imigração asiática e oriental, porém apenas o *S. mansoni* adaptou-se a região, devido ao encontro de bons hospedeiros intermediários e condições ambientais semelhantes a sua origem (KATZ e ALMEIDA, 2003). Apesar da Europa também ter recebido populações de escravos e imigrantes asiáticos e de ser comprovada a existência de ovos de *Schistosoma* em coprólitos, o parasito não se estabeleceu, devidos a inexistência de hospedeiros intermediários suscetíveis (BOUCHET et al., 2002).

No Brasil o *S. mansoni* chegou entre os séculos XVI e XVII durante a colonização portuguesa (TCHUEM TCHUENTE et al., 1995). Aqui, encontrou hospedeiro intermediário, caramujos do gênero *Biomphalaria*, com ampla distribuição geográfica, o que facilitou a instalação e a propagação do parasito, além das condições ambientais favoráveis para adaptação (REY, 2001). Os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* são moluscos de água doce, hermafroditas, inclusos na família Planorbidae, caracterizado por ter a concha enrolada em espiral plana, por essa razão, conhecido por planorbídeos (LUTZ, 1918).

No Brasil três espécies de *Biomphalaria* podem ser encontradas naturalmente infectadas pelo *S. mansoni*: *B. glabrata* (Say,1818), *B. straminea* (Dunker,1848) e *B. tenagophila* (Orbigny,1835). O *B. glabrata* chega a eliminar até 4.500 cercárias/dia e a *B. straminea* em média 400/dia. A Figura 3 ilustra a distribuição geográfica das espécies de *Biomphalaria* reconhecidas como hospedeiros intermediários de *S. mansoni* no Brasil.

No Brasil, apesar dos esforços implantados para controle da esquistossomose, é o país da América do Sul onde se concentra o maior número de casos registrados, estima-se que afete 4,6% da população, ou seja, aproximadamente 8.000.000 de pessoas (BARBOSA, 2005) e que o risco de adquirir a infecção é maior do que muitos países da África, sendo de 42,73 milhões de pessoas (WHO, 2009b). Dados do Ministério da Saúde do Brasil destacam que a esquistossomose causa mais óbitos, em média, mais de 500 por ano, que a dengue, a leishmaniose visceral e a malária. Todos os anos são registrados mais de 100 mil novos casos, sendo Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe os estados com maior índice de prevalência (Divisão de Doenças de Transmissão Hídrica e Alimentar, 2009).

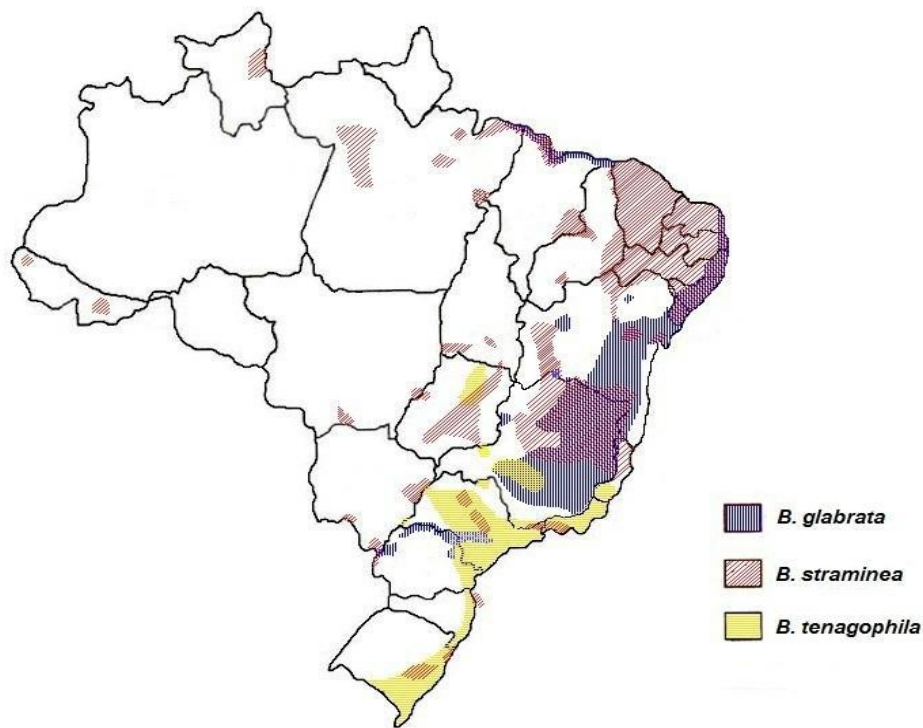


Figura 3. Distribuição geográfica dos hospedeiros intermediários de *S. mansoni*.
Extraído e adaptado de Paraense (2001).

Os estudos refletem contradições na estimativa atual da esquistossomose no país, denotando assim um desconhecimento atual da prevalência, justificando a necessidade de um inquérito nacional, com amostra controlada e representativa, com o propósito de atualizar as informações sobre esta endemia. De acordo com a portaria nº 104, de 25 de janeiro de 2011 do MS, a esquistossomose faz parte da Lista de Notificação Compulsória, e deverá ser registrada em áreas endêmicas e não endêmicas. Entretanto, os casos ainda são subnotificados (BRASIL, 2006; 2011).

Atualmente o *S. mansoni* encontra-se distribuído em 19 estados brasileiro (figura 4) desde o Maranhão até Minas Gerais, concentrando-se na Região Nordeste, especialmente nos estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe. Focos isolados têm ocorrido no Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás e Distrito Federal, porém os números de casos vêm aumentando na Região Sul do país.

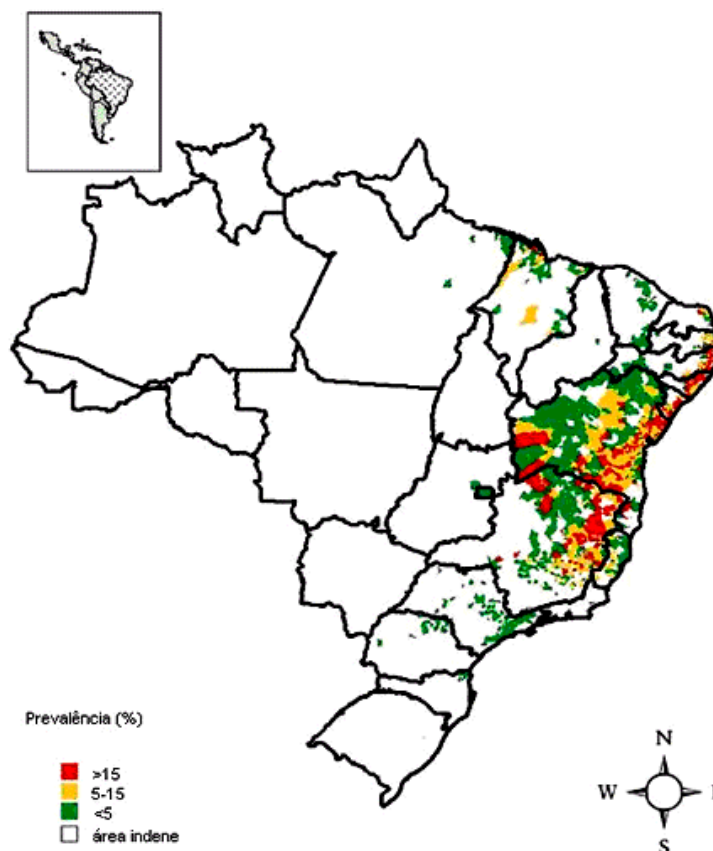


Figura 4. Distribuição da esquistossomose mansoni no Brasil (Amaral et al., 2006).

Um importante exemplo da expansão da esquistossomose no território se deu em 1997 quando Carvalho e colaboradores detectaram pela primeira vez a presença de *B.glabata* na região metropolitana de Porto Alegre, onde mais tarde foi confirmada a primeira infecção humana por *S. mansoni* autóctone na região (CARVALHO et al., 1998). Este quadro é resultante da migração e movimentação de pessoas de áreas endêmicas e grandes projetos com mudanças do quadro ambiental como a construções de estradas e represas que contribuem para o estabelecimento de novos focos de transmissão natural (SOUTHGATE et al., 2001).

Barbosa e colaboradores (2006), utilizando dados da Fundação Nacional de Saúde, constataram que Pernambuco exhibe o maior número de casos, cerca de um quarto de sua área com prevalências acima de 25% e taxas crescentes de infecção. Aproximadamente cinco milhões de pessoas residem nesta região e, assim, cerca de 62% da população pernambucana está sob risco de infecção. Só em 2006 foram notificados 762 casos (BRASIL 2006). Adicionalmente, existem localidades na região da Zona da Mata do estado com 80% de indivíduos cronicamente parasitados (figura 5) (FAVRE et al., 2001; RESENDES et al., 2005).

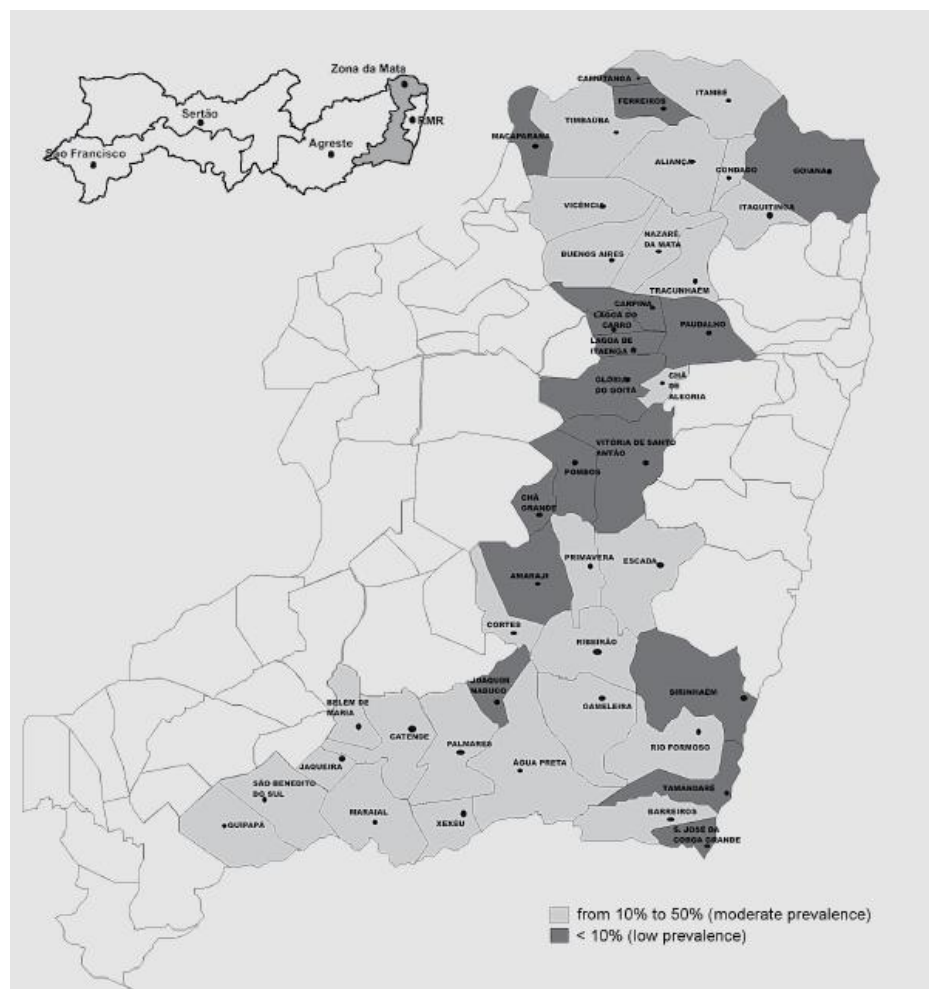


Figura 5. Prevalência de esquistossomose mansoni nos municípios da Zona da Mata de Pernambuco, de acordo com estudo feito em escolares (BARBOSA et al., 2006)

Historicamente, a esquistossomose é considerada uma doença endêmica rural em Pernambuco, sendo comprovada a existência de casos e focos de transmissão em quase todos os municípios da Zona da Mata, principalmente nas regiões canavieiras do Estado. Esta parasitose vem em expansão gradual ocasionada pelo êxodo de trabalhadores rurais em busca de trabalho. Estes trabalhadores migram de suas localidades principalmente para a região metropolitana do Recife, uma vez motivados pela concentração de renda. Alguns destes indivíduos saem de sua região infectados e acabam assumindo papel de potente disseminador dos ovos do parasito no meio ambiente, pois devido as suas condições de vida precária que assumem, sem saneamento básico e moradia adequada, acabam contaminando criadouros de moluscos existentes no litoral. Este fato tem sido comprovado no decorrer de mais de 10 anos de estudos de Barbosa e

colaboradores que já têm comprovado a existência de casos autóctones na região indene do litoral do estado e região metropolitana do Recife, além de existir novos sítios de transmissão em regiões de turismo e férias de verão (BARBOSA et al., 1996a, 1996b, 1998a, 1998b, 2000a, 2000b, 2001; SOUZA, 2008; BARBOSA et al., 2010).

Como consequência, o perfil epidemiológico da esquistossomose vem sofrendo profundas alterações comportamentais em termos de morbidade, mortalidade e situação socioeconômica. Em áreas rurais, a esquistossomose se apresenta predominantemente sob a forma crônica, incidindo na classe social de baixa renda e tendo como vetor o *B. straminea*. Enquanto no litoral e região metropolitana do Recife, a doença é destacada por casos agudos em pessoas de classe média e alta, sendo o vetor o *B. glabrata* (BARBOSA et al., 2001).

Devido aos esforços da Fundação Nacional de Saúde, ocorreu uma redução da taxa de mortalidade em Pernambuco de 3,75, em 1979, para 2,04 por cem mil habitantes, em 1996, e queda das internações por esquistossomose de 6,07, em 1984, para 4,51, em 1998 (CARMO, 1999). Entretanto, a prevalência por esquistossomose, no período de 1983 a 1995, foi superior a 30,0% em alguns municípios do Estado de Pernambuco (RESENDES, SANTOS e BARBOSA, 2005).

Desta forma, fazem-se necessários, associado às medidas de controle, novos estudos no sentido de melhor conhecer a infecção e a dinâmica das interações hospedeiro-parasita, os aspectos epidemiológicos bem como avanços de novas terapias esquistossomicidas no sentido de controlar a expansão dos casos de esquistossomose mansoni.

2.2 Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.

Os aspectos morfológicos e biológicos do *S. mansoni* devem ser analisados de acordo com seus vários estágios de desenvolvimento nos hospedeiros definitivo e intermediário. O parasito apresenta as seguintes fases evolutivas: ovo, miracídio, esporocisto, cercária, esquistossômulo e verme adulto (figura 6).

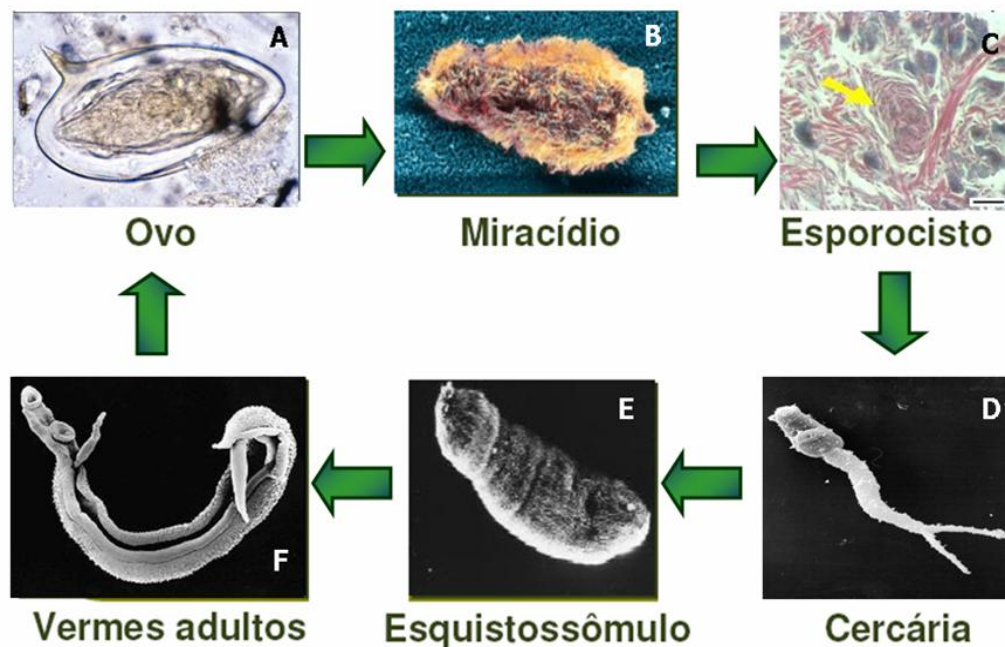


Figura 6. Formas evolutivas do *S. mansoni*. A) ovo; B) miracídio; C) Esporocisto; D) Cercária E) Esquistossômulo e F) vermes adultos macho e fêmea. (SCIENCE PHOTO LIBRARY, 2007)

O ciclo biológico do *S. mansoni* é do tipo heteroxênico com passagem obrigatória em dois hospedeiros: um definitivo representado pelo homem e alguns roedores, onde ocorre à reprodução sexuada dos vermes, e o hospedeiro intermediário que são moluscos do gênero *Biomphalaria* no qual ocorre a reprodução assexuada.

No hospedeiro definitivo inicia-se com a penetração da cercária até a eliminação de ovo maduro junto às fezes e no hospedeiro intermediário da penetração do miracídio até a liberação de cercária. Uma característica peculiar para ambos os hospedeiro é o meio aquático com passagem obrigatória para evolução do parasito, e é o local onde são encontradas as formas infectantes para os hospedeiros (KATZ e ALMEIDA, 2003).

O ovo em contato com a água e em condições específicas (luminosidade intensa, temperatura em torno 28°C e boa oxigenação), eclode liberando uma larva ciliada de vida livre denominada miracídio. O miracídio nada ativamente até o encontro do hospedeiro intermediário, este encontro é facilitado por quimiorreceptores localizados em suas fibras nervosas que são capazes de reconhecer substâncias sintetizadas e excretadas junto ao muco produzido pelo caramujo (HAAS, 1995). O miracídio em contado com o tegumento do caramujo movimenta-se

ativamente, fazendo com que suas glândulas de penetração liberem enzimas proteolíticas, que favorecem a digestão dos tecidos moles, principalmente na base das antenas e no pé do caramujo (COELHO, 1957). Esse processo dura em média de 3 a 15 minutos (REY, 2001). No interior do caramujo, o miracídio perde seu revestimento epitelial ciliado, e as demais estruturas de penetração e sofre reorganização celular, perdendo totalmente seu aspecto anterior ao se transformar em uma estrutura sacular alongada – esporocisto primário – que dá origem a esporocistos filhos. Após 72 horas, as células germinativas contidas no esporocisto filho sofrem intensas multiplicações, originando os esporocistos secundários. Estes migram ativamente através dos tecidos do molusco atingindo a glândula digestiva (COELHO, 1957).

O interior destes esporocistos é repleto de células germinativas em constante multiplicação que se diferenciam para formar um novo tipo de larva, as cercárias. Estima-se que um único miracídio seja capaz de produzir entre 100.000 até 300.000 cercárias no processo de reprodução assexuada, todas do mesmo sexo, embora as cercárias não apresentem órgãos genitais característicos nesta fase (FAUST, HOFFMAN, 1934; RAGHUNATHAN e BRUCKNER, 1975).

As cercárias abandonam intermitente o molusco infectado, preferencialmente nas horas mais claras e quentes do dia, nadam ativamente podendo penetrar via pele em várias espécies de animais, porém só se desenvolvem no hospedeiro definitivo apropriado. Durante o processo de penetração a cercária perde a sua cauda bifurcada e o corpo cercariano permanece na derme ou tecido conjuntivo por dois ou três dias, originando o esquistossômulo de pele. Este alcança a corrente circulatória, havendo também a possibilidade de migração por via linfática, e passivamente é carregado pelo fluxo sanguíneo venoso para o lado direito do coração, de onde são bombeados para os pulmões, sendo a agora conhecido como: esquistossômulo pulmonar (REY, 2001). Aproximadamente duas semanas após infecção, retornam ao coração via veias pulmonares, então ganham a grande circulação. O desenvolvimento final de esquistossômulo em verme adultos macho ou fêmea se completa nos vasos intra-hepáticos (PINTO e ALMEIDA, 1948).

Os vermes adultos acasalam, migram para as veias mesentéricas inferiores, principalmente ao nível da parede intestinal superior, onde ocorre a postura dos ovos. Contudo, apenas cerca de 50% dos ovos chegarão ao ambiente externo dando continuidade ao ciclo biológico. O restante dos ovos fica retido na mucosa intestinal ou é arrastado, pela circulação,

para o fígado, dando origem ao quadro mais característico da esquistossomose: a reação inflamatória granulomatosa hepática (figura 07) (REY, 2001).

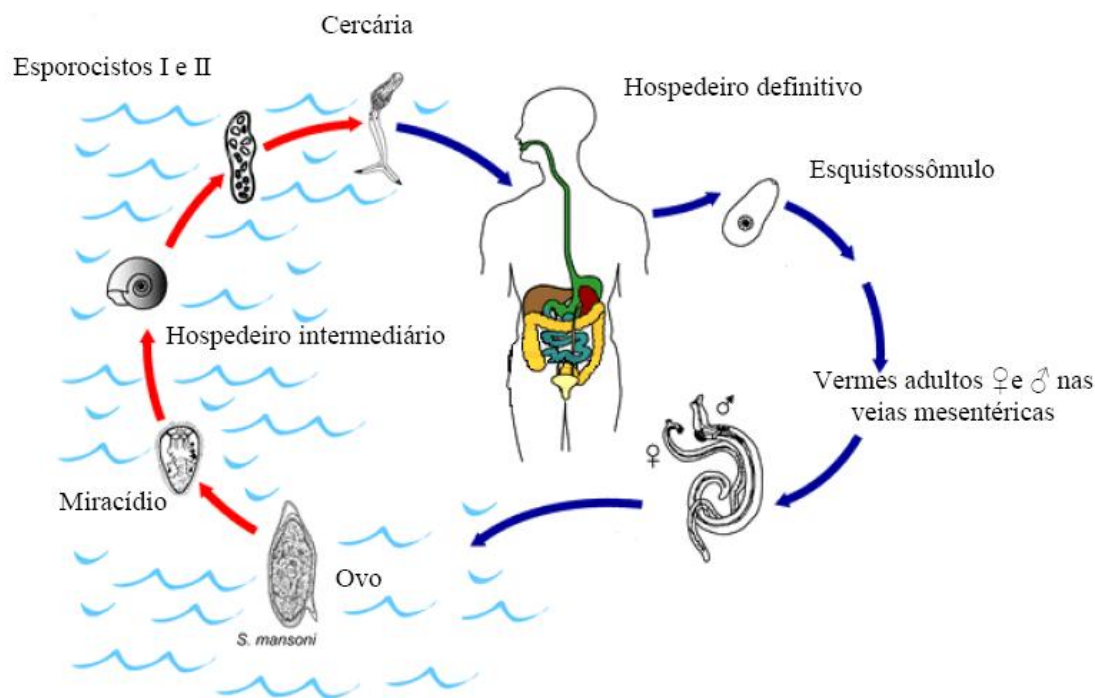


Figura 7. Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*.

Fonte: Centro de Controle de Doenças e Prevenção – Esquistossomose

2.3 Vermes adultos do *Schistosoma mansoni*

O *S. mansoni* é endoparasita sanguíneo obrigatório, Platyhelminthes (*Platy* = chato), ou seja, vermes achatados de tegumento não-segmentado, trematódeo digenético com duas ventosas como órgãos de adesão (ventosa oral e ventral ou acetábulo), simetria bilateral, ausência de exo ou endoesqueleto, aceloma - com tecido conjuntivo enchendo os espaços entre os órgãos internos, sistema digestivo incompleto (ausência de ânus), com abertura bucal na face ventral, faringe e esôfago que se bifurca originando os cecos intestinais na extremidade posterior, ausência de aparelho respiratório e sistema excretor tipo protonefrídico.

É verme dióico, o adulto macho mede cerca de 1cm de comprimento, tem cor esbranquiçada, com tegumento recoberto de minúsculas projeções (tubérculos). Apresenta o corpo dividido em duas regiões: anterior que é cilíndrica e posterior plana. A região plana sofre uma

dobra lateral no sentido longitudinal, dorso ventralmente formando um canal chamando de “canal ginecóforo” que tem a função de albergar a fêmea e fecundá-la (NEVES, 2000).

Logo atrás do acetábulo, o macho apresenta de sete a nove massas testiculares, que se abrem diretamente no canal ginecóforo, na ausência de órgão copulador os espermatozóides produzidos passam pelos canais deferentes, que se unificam em nível do poro genital, localizado no canal ginecóforo (NEVES, 2000).

A fêmea apresenta cor castanho-escuro devido a ocorrência da ingestão e quebra de hemoglobina em hemozoína no ceco (OLIVEIRA et al., 2000). A topografia da fêmea é mais simples do que as dos machos, caracterizada pelo tegumento liso, corpo fino, cilíndrico e delicado, medindo cerca de 1,2 a 1,6 cm de comprimento e instalada no canal ginecóforo. A presença das ventosas e sistema digestório é semelhante ao macho. Segui-se a vulva, útero, (que pode ter de um a dois ovos) e ovário único oblongo, na metade anterior do corpo. A região posterior da fêmea localiza-se as glândulas vitelogênicas, que ocupam os dois terços posteriores de seu corpo (OLIVEIRA et al., 2000; NEVES, 2000).

O tegumento que envolve a superfície externa do verme é constituído de uma membrana haptalaminar, sendo envolvida por duas bi-camadas lipídicas muito próximas e opostas na forma de uma membrana plasmática normal que descansa sobre uma outra região denominada de mambranocalice (KRAUTZ_PETERSON et al., 2007). O tegumento é um complexo sincicial, constituída de pregas ligadas aos canais tubulares, que formam uma interface importante entre o parasita e o hospedeiro e pode apresenta-se como a principal rota para absorção de glicose, aminoácidos e outros nutrientes de forma similar, e também a excreção de produtos metabólicos como ácido láctico (CAMACHO e AGNEW 1995). A importação de nutrientes através da superfície do tegumento implica a presença de proteínas de transportes na membrana do tegumento, tais proteínas quando importam nutrientes são expostas ao sangue do hospedeiro, desta forma o parasito fica exposto a quimioterápicos e sistema imunológico (KRAUTZ_PETERSON et al., 2007).

O processo de síntese e reparo da membrana plasmática apical e do envelope subjacente são considerados características chaves para a sobrevivência e adaptação dos vermes, em resposta aos danos causados pelos componentes imunes do hospedeiro a ação de drogas esquistossomicidas. O tegumento do *S. mansoni* apresenta poros e fissuras com a possibilidade de metabólitos entrarem ou saírem por estas aberturas, assim como numerosas e variadas

saliências e organelas tácteis ou papilas sensoriais distribuídas no tegumento dos vermes (MILLER et al., 1972).

2.4 Patogenia

A sintomatologia e evolução da esquistossomose dependem de fatores como: a espécie do parasito, a carga parasitária, da frequência das reinfecções, do estado imunológico e a idade do hospedeiro definitivo (BUTTERWORTH et al., 1985; KABATEREINE et al., 1999).

As lesões que ocorrem no organismo parasitado pelo *S. mansoni* são decorrentes, tanto da agressão direta do parasito ou de seus elementos, quanto da resposta imune do hospedeiro a tais agressões (Prata, 1996). Estudos anátomo-clínicos mostram que existem diferenças significativas entre os indivíduos portadores das várias formas clínicas da esquistossomose mansoni, que se desenvolve em duas fases: aguda e crônica. Na fase aguda, o homem pode apresentar dermatite cercariana decorrente da morte de algumas cercárias que encalham nos estratos da pele. As manifestações clínicas são micropápulas eritematosas e pruriginosas, com intensidade e duração geralmente pequenas (LAMBERTUCCI, SILVA e VOIETA, 2005).

Após desaparecimento dos sinais cutâneos, com posterior desenvolvimento dos esquistossômulos os pacientes podem apresentar febre alta, mal estar, astenia, urticária, tosse, anorexia, náuseas, vômitos, mialgias, cefaléia e diarreia (DOMINGUES e DOMINGUES, 1994). Em virtude dos sintomas mencionados correrem também em várias outras doenças infecciosas e parasitárias, o quadro clínico pode não sugerir o diagnóstico. O exame físico pode detectar abdome distendido e doloroso, com fígado e baço aumentados (REY, 2001). Essas manifestações da fase aguda não são evidenciadas em moradores de áreas endêmicas, caracterizando a forma inaparente (LAMBERTUCCI et al., 2000).

Após regressão dos sintomas, a maioria dos pacientes permanece assintomático quando então são observadas manifestações clínicas predominantemente intestinais caracterizando a forma intestinal. Dentre os sintomas observados podem ser destacado: indisposição, emagrecimento, tonturas, anorexia, empachamento pós-prandial, surtos diarreicos acompanhados ou não por cólicas, alternados por constipação intestinal. A fase aguda pode durar, em média, de trinta a sessenta dias, desaparecendo quando o paciente é submetido a

tratamento específico ou podendo evoluir para a fase crônica, caso não haja tratamento (KATZ e ALMEIDA, 2003).

Os *Schistosomas* adultos acasalam, migram para as veias mesentéricas inferiores, principalmente ao nível da parede intestinal superior, onde ocorre a postura dos ovos. Parte dos ovos chegará ao ambiente externo, o restante fica retido na mucosa intestinal ou são embolizados, pela circulação, para o fígado, dando origem ao quadro mais característico da esquistossomose: a reação inflamatória granulomatosa hepática (REY, 2001). Aqueles retidos no epitélio intestinal induzem um processo inflamatório com hiperplasia, ulceração e formação de micro abscessos (CHEN, 1991). Os pacientes podem apresentar, também, um quadro leve de anemia, em decorrência da perda crônica de sangue através do intestino, associada à eosinofilia e ao estado de carência nutricional da grande maioria da população das áreas endêmicas (DOMINGUES e DOMINGUES, 1994).

Inicialmente, devido à presença dos ovos no tecido hepático, tem-se a formação de granulomas, resultantes da resposta imunológica aos antígenos liberados pelos ovos, processo que termina com a formação de uma cicatriz fibrótica. O processo inflamatório granulomatoso, que se desenvolve ao redor dos ovos, tem como base uma hipersensibilidade do tipo celular (WARREN et al., 1967). Esta reação granulomatosa surge em decorrência da eliminação de antígenos do miracídio, chamados genericamente de SEA (*Soluble egg antigens* – Antígenos solúveis do ovo), que são eliminados através dos microporos da casca do ovo e estimulam células e citocinas específicas (HANG et al., 1974; WYLER et al., 1978), favorecendo assim, a formação de um infiltrado de células inflamatórias ao redor dos ovos (HORII et al., 1984; BOROS, 1989).

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 na matriz extracelular, a estrutura do granuloma se completa com a fibrose completa ao redor do ovo. Com o curso crônico da infecção, os diversos pontos de fibrose podem se coalescer levando à diminuição da luz dos vasos sanguíneos e a perda da elasticidade ocorrendo assim um aumento da pressão portal e consequentemente as alterações patológicas da esquistossomose na sua fase crônica (DAVIS e KRESINA, 1996).

Quando ocorre comprometimento das funções e aumento do volume do fígado e do baço, ocorre a forma hepatoesplênica, na qual são observadas alterações anatômicas, fisiopatológicas e clínicas, resultantes das lesões teciduais provocadas pelos ovos do parasito (MELO e COELHO, 2005). Nessa fase, pode existir pacientes que permanecem na sua forma clínica estacionária ou compensada, conservando um bom estado geral, com sintomatologia de pequena intensidade. Outros, porém, podem evoluir para as formas mais graves ou descompensadas apresentando hipertensão portal, circulação colateral, varizes esofagianas, hemorragias digestivas e ascite (DOMINGUES e DOMINGUES, 1994; REY, 2001).

Hipertensão portal, hepatoesplenomegalia, varizes esofagianas e circulação colateral são resultantes do bloqueio da circulação pré-sinusoidal provocado pelo desenvolvimento do tecido fibroso resultante da intensa formação de granulomas. Como consequência deste bloqueio há redução do fluxo sanguíneo no território drenado pela veia porta. A esplenomegalia, em grande parte em virtude da congestão venosa de ramos esplênicos, bem como a hiperplasia e hipertrofia das células do sistema macrofágico-linfocitário, com diferenciação plasmocitária e produção de imunoglobulinas, em virtude da presença de grande quantidade de substâncias antigênicas. (MAGALHÃES FILHO, COUTINHO, 1960).

Apesar do granuloma ser por si só patogênico, ele também protege o hospedeiro, sequestrando moléculas hepatotóxicas liberadas pelo ovo e prevenindo o dano hepático, assunto que vem sendo estudado em muitos camundongos imunodeficientes (PATTON et al., 2001).

2.5 Tratamento da Esquistossomose

Diante dos altos índices de morbidade e mortalidade provocados pelo *Schistosoma*, que representam impactos sociais e econômicos negativos, a esquistossomose representa uma das dez doenças tropicais que estão sob programas de controle da Organização Mundial de Saúde (MOREL, 2000; CHITSULO, LOVERDE, ENGELS 2004). A OMS incluiu a esquistossomose mansoni no Programa de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais Negligenciada, cujo objetivo principal é incentivar pesquisas e desenvolvimentos de novos fármacos anti-parasitários (ATTALLAH et al., 2008; ABDUL-GHANI et al., 2009; MULVENNA et al., 2010). O termo “negligenciado” ou “doença de pobre” é empregado a toda doenças que existe investimento em pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, (MRAZEK et al., 2003; RENSLO et al., 2006).

Na década de 1970 as indústrias alemãs Merck e Bayer desenvolvem uma nova droga, o praziquantel (PZQ) (Figura. 8). A droga surgiu dos estudos da atividade anti-helmíntica de compostos tranquilizantes. O PZQ foi selecionado entre mais de quatrocentos compostos e apresenta ação anti-helmíntica polivalente. No Brasil a droga é lançada comercialmente para o tratamento de cestóides, com o nome de Cestox[®] ou Cisticide[®] (SEUBERT et al., 1977).

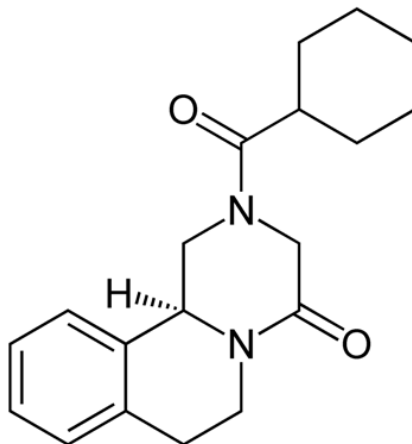


Figura 8. Estrutura química do praziquantel

Os primeiros estudos com animais infectados foram realizadas em 1977, quando atividade esquistossomicida foi detectada (GONNERT, ANDREWS, 1977) e chamou a atenção pelo amplo espectro de ação sobre diferentes espécies do gênero *Schistosoma*. Outros estudos relataram atividade do PZQ contra o *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. matheei*, outras espécies de trematódeos (*Opisthorchis sinensis*, *O. viverrini*, *Paragonimus* spp., *Fasciolopsis buski*, *Heterophyes heterophyes* e *Metagonimus yokogawai*) e cestóides (*Taenia solium*, *T. saginata*, *Hymenolepis nana*, *H. diminuta*, *Diphyllobotrium latum* e *D. pacificum*) (WEBBE, JAMES, 1977; WEGNER 1984; BOUREE 1991; UTZINGER et al., 2003; SHUHUA 2005; JEZIORSKI, GREENBERG, 2006; SHAOHONG et al., 2005).

Em 1978 em cooperação com a OMS, os primeiros ensaios clínicos foram realizados em regiões endêmicas para *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. intercalatum* (KATZ et al., 1999; DAVIS et al., 1979; ISHIZAKI et al., 1979). Neste estudo foi descoberto que o PZQ foi bem tolerado por pacientes de todas as idades, com diferentes formas clínicas da esquistossomose (FROHBERG, 1984). Outros estudos indicaram baixa toxicidade e sem riscos mutagénico (FROHBERG, 1984; KRAMERS et al., 1991). Os ensaios pré-clínicos

comprovaram eficiência do PZQ no decorrer de 5-6 semanas após a infecções, entretanto falhas são relatadas em casos de infecção entre a 1ª a 5ª semanas de infecções (GONNET, ANDREWS 1977; XIAO et al, 1985; SABAH et al., 1986).

A Bayer produz o PZQ em comprimido de 600mg. Antes da patente do PZQ pela Bayer ser definida, a República Popular da China desenvolve a síntese e fabricação do PZQ com o nome de Pyquiton®. Posteriormente a Shim Poong Pharmaceutical Company na Coreia do sul, Eipico no Egito e Farmanguinhos no Brasil passam a produzir também o praziquantel, o que acarretou uma queda no preço final do medicamento. Atualmente o PZQ é o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose, isso se deve a razões como: ativo contra todas as espécies de *Schistosoma*, ausência de efeitos colaterais sérios, administração de dose oral, custo competitivo e longa experiência clínica, mostrando que é seguro, efetivo e de fácil administração, com cura parasitológica de 80% a 90%. Os efeitos colaterais mais frequentes são: dores abdominais, diarreia, náusea, vômito e anorexia (SANTOS et al., 1979). Diversos estudos com o PZQ demonstraram que a droga não apresenta mutagenicidade e genotoxicidade nos esquemas terapêuticos utilizados (KRAMERS et al., 1991).

A maior desvantagem do PZQ sobre o *Schistosoma* é a sua baixa eficácia contra as formas imaturas (GRYSSELS et al., 2001) e vermes fêmeas (PICA-MATTOCIA, CIOLI, 2004). Alternativas têm sido propostas para solucionar este problema, tais como a associação do PZQ com outras drogas capazes de eliminar as formas imaturas do parasito. O uso associado da oxamniquine com o PZQ, que possuem diferentes mecanismos de ação, tem apresentado uma maior eficácia sobre o *S. mansoni* quando comparada à atividade isolada de cada droga (DELGADO et al., 1992; GRYSHECK et al., 2004).

O pico de ação de PZQ ocorre 1-2 horas após o tratamento. A sua eliminação é feita através da urina e fezes, sendo que mais de 80% da droga é eliminada após 24hs (STEINER et al., 1976). Os mecanismos moleculares de ação do PZQ não são bem conhecidos (CIOLI, 2004). Entretanto, alguns estudos têm demonstrado que drogas esquistossomicidas causam extensas alterações tegumentares nos vermes (LIMA et al., 1994; FALLON et al., 1996). Ademais, as drogas esquistossomicidas podem atuar sobre os músculos dos vermes, levando a alterações morfológicas, tais como vacuolização do sincício tegumentar e a formações de bolhas na superfície do tegumento (ALBUQUERQUE et al., 2007).

O desenvolvimento do PZQ em 1970 e o vasto uso na década de 80 reduziram de forma significativa a morbidade e mortalidade por esquistossomose (BERGQUIST, 2002). Entretanto, a droga não impede a reinfeção, e o tratamento repetido é geralmente uma prática comum em áreas endêmicas (MAGNUSSEN, 2003), considerado um perigo em potencial para o surgimento de cepas *Schistosoma*-praziquantel-resistentes (STELMA et al., 1995; STELMA et al., 1997, LIANG et al., 2001). Há inúmeras publicações relatando resistência ao PZQ, seja de trabalho experimental, ou de trabalho de campo (DOENHOFF et al., 2002). Stelma e colaboradores (1995) relataram a existência de cepas tão resistentes que a administração da dose padrão de 40 mg/Kg de PZQ resultou numa taxa de eliminação dos vermes de apenas 18%. Em estudos posteriores, evidenciou-se que mesmo o aumento da dose de PZQ de 40 para 60 mg/Kg não levou a resultados satisfatórios (GUISSÉ et al., 1997).

Nos últimos 30 anos houve um aumento significativo na terapêutica da esquistossomose, caracterizado pelo desenvolvimento do PZQ, droga ditas como “ideal” pelas propriedades farmacologias que apresenta. É possível que a descoberta destas drogas, associado à ocorrência exclusiva da esquistossomose em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, ou seja, países com baixo poder aquisitivo de compra e de pessoas economicamente ativas, tenham levado a indústria farmacêutica a não investirem em novas tecnologias para desenvolver novos fármacos para o controle da esquistossomose.

Uma vacina profilática seria o método ideal para o controle da esquistossomose, seja sozinha ou associada ao tratamento quimioterápico (BERGQUIST et al., 2005). Atualmente, não existem vacinas eficazes disponíveis, contudo há uma extensiva busca na identificação de novos alvos para o ataque imunológico. Diante deste fato, o desenvolvimento de antígenos capazes de induzir proteção contra a infecção esquistossomótica mobiliza muitos grupos de pesquisa e vários antígenos promissores estão em estudo como: a paramiosina (HIRSCH et al., 1997), o Sm14 (RIBEIRO et al., 2002), o Sm28GST (PANCRE et al., 1994) e PIII (GUSTAVSON et al., 2002). Certamente existem vários outros antígenos igualmente promissores, que merecem ser avaliados com o objetivo de desenvolver uma vacina (PEARCE, 2003). No entanto, até o momento, nenhuma cumpriu os requisitos de biossegurança e eficácia comprovada para uso em seres humanos (BERGQUIST 1998; BERGQUIST, COLLEY 1998). Com o esclarecimento do genoma do *S. mansoni* a descoberta da vacina pode estar mais próxima (VERJOVSKI-

ALMEIDA et al., 2003). Há uma vacina, na fase II de pesquisa e desenvolvimento, a Bilhvax (CAPRON et al., 2002).

No quadro atual, a ausência de vacinas disponíveis e de ações eficazes na saúde pública fazem da quimioterapia o único recurso imediato para minimizar a prevalência e incidência da esquistossomose no mundo (CIOLI, PICA-MATTOCCIA, ARCHER 1995). Este quadro, não apenas justifica, mas aponta a necessidade de imediato planejamento, desenvolvimento e pesquisas com novos fármacos que apresenta potencial atividade esquistossomicida (CIOLI, 2000).

2.6 β -lapachona

As quinonas representam uma ampla e variada família de metabólitos de distribuição natural. Com base na sua estrutura molecular, são divididas de acordo com o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídica: benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico; antraquinonas - um anel antracênico linear ou angular. β -lapachona (lap- β , Figura 9) (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona, C₁₅H₁₄O₃, MM 242,3), um naftoquinona lipofílico, análogo semi-sintética do composto lapachol obtido da casca de árvores da família Bigoniaceae e Verbenaceae comumente encontrados em muitas regiões do Brasil. Particularmente no Brasil, seu extrato é amplamente utilizado na medicina popular há séculos para controlar várias doenças (PINTO et al. 1977).

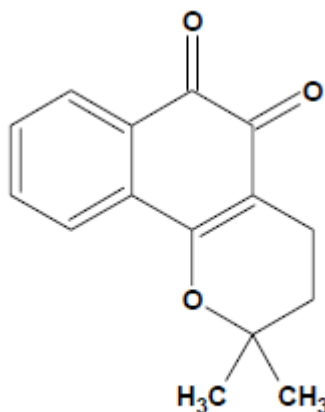


Figura 9 - Estrutura química da β -Lapachona

A β -lap tem sido encontrada como constituinte minoritário durante o isolamento de outras naftoquinonas do cerne das árvores de ipês (DIAZ, MEDINA 1996). Foi em 1892 que Samuel Hooker sintetizou pela primeira vez a β -Lap a partir do lapachol (HOOKER 1892 e 1896). No Brasil existem aproximadamente 46 espécies de *Tabebuia* das quais o lapachol pode ser facilmente extraído da serragem. Essas espécies são conhecidas popularmente por Lapacho ou ipês, como por exemplo, o ipê roxo e o ipê branco (Figura 10 A e B) (WILHANSON, SCOTT-FINNINGAN 1981).



Figura 10 Ipês roxo e branco

Orto-naftoquinona e seus derivados foram inicialmente investigados no final do século XIX e início do século XX pelo químico Samuel Hooker. Em laboratório a β -lap é sintetizada pela isomerização do lapachol com ácido sulfúrico. Os protocolos comumente empregados para síntese são baseados na ciclização catalisada do lapachol extraído naturalmente ou sintetizado a

partir da 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (Lausona) em ácido sulfúrico por ataque nucleófilo de oxigénio de cadeia lateral isoprenilo e purificação mediante recristalizações adicionais (HOOKER 1892 e 1896) (figura 11). O produto final são cristais aciculares, laranja-avermelhado e visíveis a olho nu (figura 9) (HOOKER 1936, SUN, GEISER, FRYDMAN, 1998).

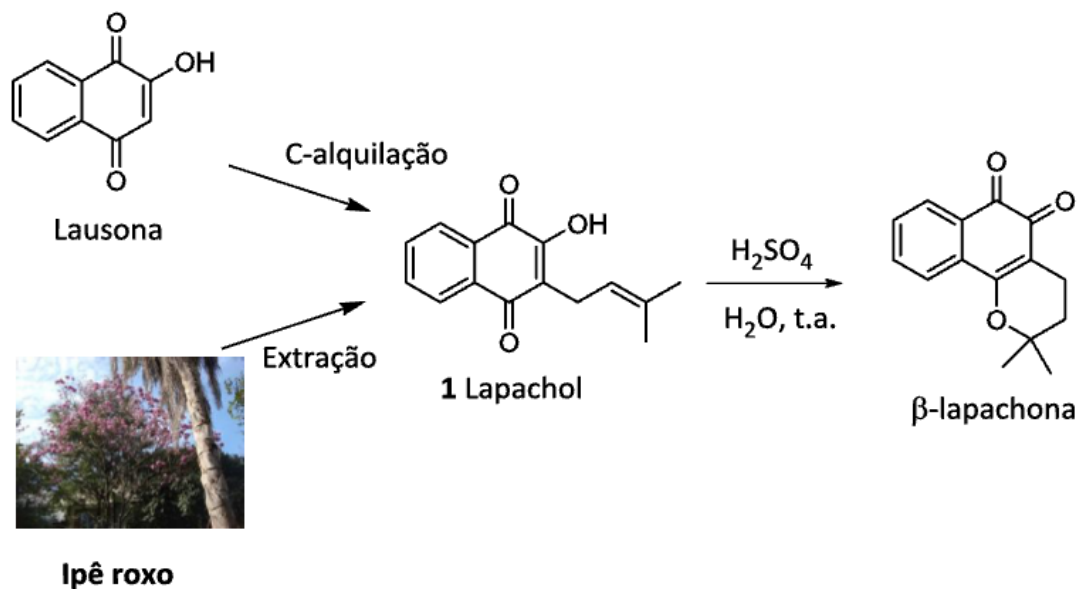


Figura 11. Esquema simplificado da síntese da β -lapachona a partir do lapachol por catálise ácida.

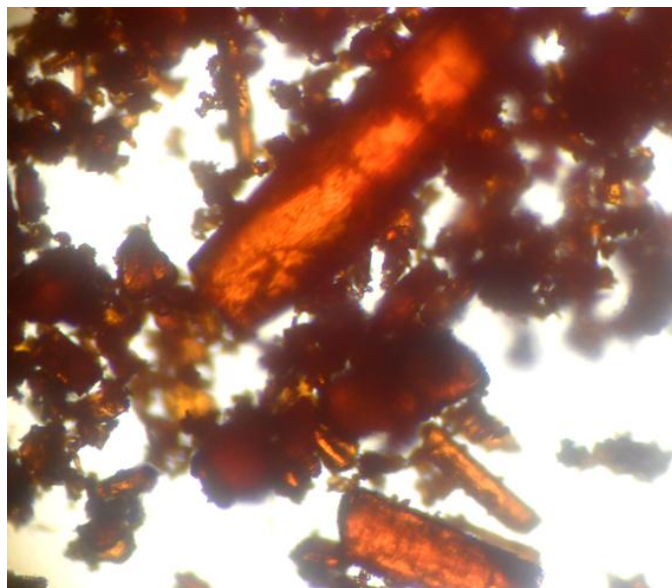


Figura 12. Microscopia óptica dos cristais de β -lapachona (aumento de 100x)

No campo químico e biológico das orto-naftoquinonas não poderíamos deixar de expor as contribuições científicas de dois grandes pesquisadores brasileiros: Oswaldo Gonçalves de Lima e Antônio Ventura Pinto, primeiros a realizarem modificações estruturais nas orto-naftoquinonas. O primeiro voltou-se a investigações farmacológicas e o segundo para a síntese de novas substâncias e suas atividades biológicas. Eles dedicaram muito tempo de suas vidas aos estudos com o lapachol e a β -lap e formaram diversos pesquisadores nesta linha de investigação. Atualmente, diversos grupos de pesquisas no Brasil e em outros países têm trabalhado intensamente com orto-naftoquinonas, na busca de compostos bioativos.

Apesar de muito interesse sobre a β -lap, seu mecanismo de ação ainda não é completamente elucidado. β -lap, e outras naftoquinonas, depois de sofrer redução enzimática *in situ* (redox ciclo) pode produzir espécies reativas de oxigênio (EROS) ($O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, 1O_2 e H_2O_2) (SILVA et al., 2012.). Assim, β -lap acelera hipóxia intracelular de células tumorais e de micro-organismos através da produção de ânion superóxido, aumento peroxidação lipídica e desorganização proteína (MELISSA et al 2007; PINTO e CASTRO 2009; Bey 2007; SALAS et al. 2008), inativando as enzimas topoisomerases I (BOOTHMAN, TRASK e PARDE1989) e II (KRISHNAN e BASTOW 2000). A redução de um elétron é catalisada por redutases como a NADPH-citocromo P450 redutase, citocromo b5 redutase, xantina oxidoreductase e ubiquinona oxidoreductase, resultando na formação de semiquinonas. A redução de dois elétrons é catalisada por NAD(P)H/dihidronicotinamida ribosídeo (NRH):quinona oxidoreductase (NQOs), e tem como produto final hidroquinonas, relativamente mais estáveis (NIOI, HAYES 2004).

Apesar da β -Lap ainda não ser um fármaco, tem sido alvo de inúmeras pesquisas em humanos e animais experimentais. *In vitro* β -lap induz a formação de peróxido de hidrogênio, fragmentação de DNA e altera a superfície de epimastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (MENNA-BARRETO 2007; SALAS et al., 2008). β -lap apresenta propriedades antimaláricas *in vitro* e *in vivo* contra cepas sensíveis e resistentes à cloroquina (ANDRADE-NETO 2004; PÉREZ-SACAU et al., 2005), antifúngicas na infecção disseminada por *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* em camundongos imunossuprimidos (MEDEIROS et al., 2010), antibacteriana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (KENNETH et al. 2012), antiinflamatória (SITÔNIO et al., 2012) e inibir a replicação do vírus HIV-1, da transcriptase reversa do vírus da mieloblastose aviária, de leucemia murina Rauscher e do α -polimerase de DNA (SCHUERCH e WEHRLI 1978; LI et al., 1993).

Sem dúvidas a característica mais importante da β -lap é a sua propriedade antitumoral *in vitro* e *in vivo* contra diferentes linhas celulares (PARK et al., 2005; SUZUKI et al., 2006; Moon et al., 2010). Na clínica, algumas drogas antitumorais (dactinomicina, doxorubicina, bleomicina e mitomicina C) apresentam grupamento quinona e isto reforça a importância deste grupo químico para o desenvolvimento de novas drogas antineoplásicas e para outras enfermidades (GEWIRTZ, 1999; GALM et al., 2005; ZHANG 2006; DONG et al., 2009).

Na busca de novos análogos da β -Lap, muitas modificações químicas podem ser realizadas em sua estrutura. O oxirano foi o primeiro derivado monossustituído preparado por Pinto e colaboradores, em 1977, com a finalidade obter compostos que pudessem inibir topicamente a penetração de cercárias do *S. mansoni* em camundongos. Neste experimento, dos 23 derivados naftoquinonas sintetizados, 15 bloqueou a penetração de cercárias de *S. mansoni* quando aplicado na cauda dos camundongos 24 horas antes da exposição a infecção via caudal (PINTO et al., 1997). Segundo Haeberlein e Hass (2008) o sucesso da infecção pelo *S. mansoni* encontra-se na dependência da penetração das cercárias na pele do hospedeiro definitivo e a sua adequada adaptação no primeiro 4-5 dias nos estratos da pele (HAEBERLEIN, HASS 2008).

Outros estudos envolvendo o controle da esquistossomose a partir de derivados naftoquinonas incluem atividades moluscidas contra o molusco *Biomphalaria glabrata* (LIMA et al., 2002; MARTINEZ, BENITO, 2005; CAMARA et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009).

Diante do exposto e considerando as propriedades farmacológicas da β -Lap, torna-se necessária uma investigação direcionada a sua análise sobre o *S. mansoni* empregando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, aplicando uma abordagem mais ampla dos aspectos parasitológicos antes ainda não estudados.

REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI R, LOUTFY N, SAHN A.E, HASSAN A. Current chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges, **Parasitol. Research**, 10, 955–965, 2009.
- ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; PITTA, M.G.R.; IRMÃO, J.I. et al. Tegumental alterations in adult *Schistosoma mansoni* treated with imidazolidine derivatives. **Lat. Am. J. Pharm.**, 26, 65-9, 2007.
- ALMEIDA-MACHADO, P. The Brazilian program for schistosomiasis control. **The A. J. of Tropical Med. and Hygiene**, 31, 76-86, 1982.
- AMARAL R, TAUIL P.L, LIMA D.D, ENGELS D.N.A. Analisy of the impacto f the schistosomiasis control programme in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 101, 79-85, 2006.
- ANDRADE, Z.A, RAMOS, E.G, REIS, M.G. A patologia da esquistossomose mansoni no coelho. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 83, 323-333, 1988.
- ANDRADE-NETO, V.F, GOULART MOF, SILVA-FILHO J.F, SILVA M.J, PINTO M.C.F.R, PINTO A.V, ZALIS, M.G, CARVALHO L.H, KRETTLI, A.U. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. **Bioorg Med Chem Lett** 14:1145–1149. 2004.
- ANTUNES RMP, LIMA EO, PEREIRA MSV, CAMARA CA, ARRUDA TA, CATÃO RMR, BARBOSA TP, NUNES XP, DIAS CS, SILVA TMS. Atividade antimicrobiana “*in vitro*” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Rev. Bras. Farmacogn.** 16, 517-524, 2006.
- ARCHER, S. e Yarinsky, A. Recent developments in the chemotherapy of schistosomiasis. In Jucker, E. (Ed) **Progress in Drug Research**. Basel: Birhäuser Verlag, 1972.
- ATTALLAH AM, WAHBA MA, ELSHEIKHA HM, ABBAS AT, ABDEL AZIZ MM, EL-HEMALY MA. Outcomes of *Schistosoma mansoni* infection in outbred albino mice exposed to Larvin contaminant. **Parasitol Res.**, 103:567–576, 2008.
- AZZA, M.M., NADIA, M.M., SOHAIR, S.M., *Sativa* seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 100, 205-211, 2005.
- BABULA P.VOJTE ADAMB, KIZEK R. SLADKY Z. HAVEL. Naphthoquinones as allelochemical triggers of programmed cell death. **Environmental and Exp. Botany**, 6,5330–337, 2009.
- BARBOSA, C. S.; ARAUJO, K. C.; SEVILHA, M. A.; MELO, F.; GOMES, E. C. S. & SOUZA-SANTOS, R. Current epidemiological status of schistosomiasis in the state of Pernambuco, Brazil. **Mem. do Inst. O. Cruz**, 105, 549-554, 2010.
- BARBOSA, C. S.; COUTINHO, A. L.; MONTENEGRO, S. M. L.; ABATH, F.; SPINELLI, V.. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco. **Cad. S. Pública**, 17, 725-728, 2001.
- BARBOSA, C. S.; GONÇALVES, J. F.; ALBUQUERQUE, Y & BARBOSA, F. S. Urban Schistosomiasis im Itamaracá island, Brasil: epidemiological factors involved in the recent endemic process. **Mem. do Inst. O. Cruz**, 93, 265-266, 1998a.
- BARBOSA, C. S.; PIERI, O. S. Aspectos epidemiológicos e malacológicos da esquistossomose mansônica na Ilha de Itamaracá, Pernambuco. **Rev. de Saúde Pública**, 34(4): 33-41, 2000.
- BARBOSA, C.S. Esquistossomose em Pernambuco: Determinantes Bioecológicos e Sócio-culturais. Tese de Doutorado, **Escola Nacional de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, 148 p., 1996a.
- BARBOSA, C.S. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia em Pernambuco. **Rev. de Saúde Pública**, 30(06): 609-616, 1996b.

- BARBOSA, C.S. Padrão Epidemiológico da Esquistossomose em Comunidade de Pequenos Produtores Rurais de Pernambuco. **Cad. de Saúde Pública**, 14(01):129-137, 1998b.
- BARBOSA, M. A. et al. Quantitative aspects of the migration and evolutive *Schistosoma mansoni* on mice. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 20: 121-132, 1978.
- BARTH, L. R.; FERNANDES, A. P. M.; RIBEIRO-PAES, J. T. et al. Effects of Goyazensolide during *in vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 92, 427-429, 1996a.
- BARTH, L. R.; FERNANDES, A. P. M.; RIBEIRO-PAES, J. T. et al. Oviposition by *Schistosoma mansoni* during *in vitro* cultivation. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 38, p.423-427, 1996b.
- BASCH, P.F, SAMUELSON, J. Cell biology of schistosomes. I. Ultrastructure and transformations. In: **Wyler DJ (ed) Modern parasite biology: cellular, immunological, and molecular aspects**. Freeman, New York, 91–106, 1990.
- BENTLE, M.S., REINICKE, K.E., BEY, E.A., SPITZ, D.R., BOOTHMAN, D.A., 2006. Calcium-dependent modulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair. *J. Biol. Chem.* 281, 33684-33696.
- BENTLE, M.S.; BEY, E.A.; DONG, Y.; REINICKE, K.E.; BOOTHMAN, D.A. New tricks for old drugs: The anticarcinogenic potential of DNA repair inhibitors. **J. Mol. Histol.**, 37, 203–218, 2006.
- BERGQUIST, N. R., COLLEY, D. G. Schistosomiasis vaccines: research to development. **Parasitol. Today**, Oxford, v.4, n.3, p.99-104, 1998.
- BERGQUIST, N.R. Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.93 Suppl 1, p.95-101. 1998a.
- BERGQUIST, N.R. Schistosomiasis: from risk assessment to control. **Trends Parasitol.** 18, 309-314, 2002.
- BERGQUIST, N.R., LEONARDO, L.R., MITCHELL, G.F., Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? **Trends Parasitol.** 21, 112-117, 2005.
- BEY, E.A., BENTLE, M.S., REINICKE, K.E., DONG, Y., YANG, C.R., GIRARD, L., MINNA, J.D., BORNHANN, W.G., GAO, J., BOOTHMAN, D.A., 2007. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by beta-lapachone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 28, 11832-11837.
- BINA, J. C.; PRATA, A. Esquistossomose na área hiperendêmica de Taquarandi: Infecção pelo *Schistosoma mansoni* e formas graves. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 36, 211-2116, 2003.
- BOISSIER J, MONE H Male-female larval interactions in *Schistosoma mansoni* infected *Biomphalaria glabrata*. **Int J Parasitol** 31:352–358, 2001.
- BOISSIER, J.; DURAND, P. e MONÉ, H. PCR effectiveness for sexing *Schistosoma mansoni* cercariae: application for sexing clonal cercarial populations. **Mol. and Bioc. Parasit.** 112: 139-141, 2001.
- BOOTHMAN DA, TRASK DK, PARDEE AB. Inhibition of Potentially Lethal DNA Damage Repair in Human Tumor Cells by β -Lapachone, an Activator of Topoisomerase I. **Cancer Res** 49:605-612, 1989
- BOROS, D.L. Immunopathology of *Schistosoma mansoni* infection. **Clin. Microbiol. Rev.** 2, 250-269. 1989.
- BOTROS, S, WILLIAM, S, HAMMAM, O, ZÍDEK, Z, HOLÝ, A. Activity of 9-(S)-[3-hydroxy-2 (phosphonomethoxy)propyl]adenine against Schistosomiasis mansoni in mice. **Antimicrob Agents Chemother**, 47:3853–3858, 2003.
- BOUCHET, F. et al, First recovery of *Shistosoma mansoni* eggs from a latrine in Europe (15-16 th Centuries). **The J. of Parasit.**, 88: 404-405, 2002.

- BOUREE, P. Successful treatment of *Taenia saginata* and *Hymenolepis nana* by single oral dose of praziquantel. **J. of the Egyptian Society of Parasit.**, 21, 303-307, 1991.
- BRACHS S, HAAS W. Swimming behaviour of *Schistosoma mansoni* cercariae: responses to irradiance changes and skin attractants. *Parasitol Res* 102:685–690, 2008
- BRASIL. Gabinete do Ministro: Portaria nº 104 de 25 de janeiro de 2011. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n.18, 26 de jan. seção 1.p37-38.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em saúde. Guia de vigilância epidemiológica e controle da mielorradiculopatia esquistossomótica. **Ministério da Saúde**. Secretária de Vigilância em saúde. (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Brasília: **Ministério da Saúde**, 2006.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de informação de agravos de notificação. Esquistossomose**. Brasília, DF, 2006.
- BUTTERWORTH, A.E., et al. Immunity after treatment of human schistosomiasis mansoni. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 79, 393-408, 1985.
- CAMACHO, M.; AGNEW A. *Schistosoma*: Rate of glucose import is altered by acetylcholine interaction with tegumental acetylcholine receptors and acetylcholinesterase. **Exp. Parasit.** 81, 584-591, 1995.
- CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S.; SILVA, T. G.; MARTINS, R. M.; BARBOSA, T. P.; PINTO, A. C.; VARGAS, M. D. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-[1,4]naphthoquinone and derivatives. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, 19–23, 2008.
- CAMARGO S. The role of chemotherapy in special program for control of schistosomiasis. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 1: 98-104, 1980.
- CAPRON, A., RIVEAU G., BARTLEY, P., McMANUS, D.P. Prospects for a schistosome vaccine. *Curr. Drug Targets Immune Endocr Metab Disord.* 2, 281-290, 2002.
- CARMO EH. Morbidade e mortalidade por esquistossomose mansônica na Região Nordeste do Brasil [Tese de Doutorado]. Salvador: **Inst. de Saúde Coletiva, Univ. Federal da Bahia**; 1999.
- CARVALHO, O.S. ET AL. First report of *Biomphalaria glabrata* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. O. Cruz.** 93, 39-40, 1998.
- CAVALCANTE FA, SILVA JLV, CARVALHO VMN, CAMARA CA, SILVA TM, PINTO AC, ET AL. Spasmolytic activity of lapachol and its derivatives, alpha and beta-lapachone, on the guinea-pig ileum involves blockade of voltage-gated calcium channels. **Rev Bras Farmacog** 18:183–189, 2008.
- CHEEVER A.W. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. **Bull World Health Organ** 39:328–331, 1968.
- CHEEVER, A. W.; LENZI, J. A.; LENZI, H. L. et al. Experimental models of *Schistosoma mansoni* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97, 917-940, 2002.
- CHEEVER, A.W., Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull. World. Health. Organ.* 39, 328–331, 1968.
- CHEN, M.G. Relative distribution of *Schistosoma japonicum* eggs in the intestine of man: a subject of inconsistency. **Acta Trop.** 48, 163-171. 1991.
- CHITSULO L, LOVERDE P, ENGELS D. Schistosomiasis. **Nat Rev Microbiol** 2: 12–13, 2004.
- CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, 77: 41–51, 2000.

- CHRISTOPHERSON, J.B. The successful use of antimony in bilharziosis. Adminidtered as intravenous injections os antimonium tartaratum (tartar emetic). **Lancet ii** 325-327, 1918.
- CIOLI D, BOTROS S.S, WHEATCROFT-FRANCKLOW K, et al. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. **Int J Parasitol**, 34, 979–987, 2004.
- CIOLI, D. PICA-MATTOCCIA, L. ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present ... na future? **Pharmac. Ther.** 68, 35-85, 1995.
- CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L. ARCHERS, S. Drug resistance in schistosomes. **Parasitology Today**, 9, 162-166, 1993.
- CIOLI, D., Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? **Current Opinion in Infectious Diseases**, 13, 659-663, 2000.
- CIOLI, D., VALLE, C., ANGELUCCI, F., MIELE, A.E., 2008. Will new antischistosomal drugs finally emerge? **Trends. Parasitol.** 24, 379–382.
- COELHO, M. V. Aspectos do desenvolvimento das formas larvais de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis nigricans*. **Rev. bras. Biol.**, 17:325-37, 1957.
- COELHO, M.V. *Schistosoma mansoni*. O parasito. In: Sales da Cunha, A esquistossomose mansoni. São Paulo: **Editora Sarvier, Universidade de São Paulo**. 1970.
- COELHO, T.S., SILVA, R.S., PINTO, A.V., PINTO, M.C., SCAINI, C.J., MOURA, K.C, ALMEIDA, DA SILVA, P. Activity of β -lapachone derivatives against rifampicin-susceptible and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis (Edinb)** 90:293-297, 2010.
- COJOCEL, C. NOVOTOVY, L VACHALKOVA, A. Mutagenic and carcinogenic potential of menadione. **Neoplasma**, 53, 316-323, 2006.
- COURA, J.R. et al. Experiências de campo com oxamniquine oral no tratamento da esquistossomose mansoni. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 22, supl. 4:195-202, 1980.
- DA SILVA E. N J., CAVALCANTI B. C., GUIMARÃES T. T., et al. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea* spp. **J. Nat. Prod.** 59:423-424, 1996
- DAVIS, A., BILES, J. E. & ULRICH, A., M. Initial experiences with praziquantel in the treatment of human infections due to *Schistosoma haematobium*. **Bulletin of the World Health Organization**, 57, 773-779, 1979.
- DAVIS, B.H. e KRESINA, T.F. Hepatic fibrogenesis. **Clin Lab Med**, v.16, n.2, p.361-375. 1996.
- DAY HB. anthelmintic work in Egypt. **Lancet**, 1,435-37, 1924.
- DE ABREU, F.C. FERREIRA, D.C.M, WADHAWAN, J, AMATORE, C. FERREIRA, V.F, DA SILVA, M.N, DE SOUZA, M.CB.V, GOMES, T.S, XIMENES, E.A, GOULART, M.O.F. Electrochemistry of β -lapachone and its diazoderivative: relevance to their compared antimicrobial activities. **Electrochem. Commun.**, 7, 767-772, 2005.
- DELGADO, V. S. et al. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains and on both sexes of the parasite. **Parasitol. Res.**, 78, 648-54, 1992.
- DESPRÈS, L.; IMBERT-ESTABLET, D.; E MONNEROT, M. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence of recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. **Mol. and Bioc. Parasit.** 60:221-230, 1993.
- DIAZ, F, MEDINA, J.D. Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea* ssp. *neochrysanta*. **J Nat Prod**, 59:423-424, 1996.

- DIVISÃO DE DOENÇAS DE TRANSMISSÃO HÍDRICA E ALIMENTAR. Centro de Vigilância Epidemiológica Professor Alexandre Vranjac. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. Novas estratégias para a vigilância epidemiológica da esquistossomose no Estado de São Paulo. **Rev. Saúde Pública**, 43, 728-30, 2009.
- DOENHOFF, M. J., KUSEL J. R., COLES G. C., CIOLI, D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 96, 465-469, 2002.
- DOENHOFF MJ, CIOLI D, UTZINGER J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr Opin Infect Dis** 21:659-667, 2008.
- DOENHOFF MJ, HAGAN P, CIOLI D, SOUTHGATE V, PICA-MATTOCCIA L, BOTROS S, COLES G, TCHUEM TCHUENTÉ LA, MBAYE A, ENGELS D. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. **Parasitology** 136:1825–1835, 2009
- DOMINGUES A.L.C.; DOMINGUES L.A.W. Forma intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica. In: MALTA, J. (Ed). *Esquistossomose mansônica*. Recife: **Ed. Universitária da UFPE**, cap. 5, p. 91-105, 1994.
- DONG Y, CHIN SF, BLANCO E, BEY EA, KABBANI W, XIE XJ, BORNMANN WG, BOOTHMAN DA, GAO J. Intratumoral delivery of beta-lapachone via polymer implants for prostate cancer therapy. **Clin Cancer Res** 15:131-139, 2009.
- DOS SANTOS, A.F, FERRAZ, P.A.L, PINTO, A.V., PINTO, M.C.R.F, GOULART, M.O.F, SANT'ANA, A.E.G (2000) Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. **Int J Parasitol** 30:1199-1202
- DRUILHER, P.; HAGAN, P.; ROOK, G. A. The importance of models of infection in the study of disease resistance. **Trends. Microbiol.**, 10, 38-46, 2002.
- DUVAL, R. H.; DEWITT, W. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 16, 483-486, 1967.
- EDINGL, E, TERSAN, A. WAITE, J.F. Effect of 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone on Glycolysis of *Schistosoma mansoni*. **Proc Soc Exp Biol Med** 64:111-113, 1947.
- EL-RIDI, R.; OZAKI, T.; INABA, T. et al. *Schistosoma mansoni* oviposition *in vitro* reflects worm fecundity *in vivo* individual, parasite age and host dependent variations. **Int. J. Parasitol.**, 27, 381-7, 1997.
- FAGHIRI Z, SKELLY PJ. The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake **FASEB J** 23:2780–2789, 2009.
- FALLON, P. G.; FOOKES, R. E; WHARTON, G. A. Temporal differences in praziquantel- and oxamniquine-induced tegumental damage to adult *Schistosoma mansoni*: implications for drug-antibody synergy. **Parasitol.**, 112, 47-58, 1996.
- FAUST, E.C. E HOFFMAN, W.A. Studies on *Schistosoma mansoni* in Puerto Rico. I The extramammalian phases on life-cycle. **Puerto Rico J. of Public Health and Trop. Med.**, 10, 1-47, 1934.
- FAVRE, T.C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 em Pernambuco. **Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop.**, 34, 569-576, 2001.
- FENWICK A et al. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends parasitol** 19:509–15, 2003.
- FERREIRA SB, SALOMÃO K, DE CARVALHO DA SILVA F, PINTO AV, KAISER CR, PINTO AC, FERREIRA VF, DE CASTRO SL. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone analogues. **Eur. J. Med. Chem.**, 46, 3071-3077, 2011.

- FERREIRA, HELENA C. CASTRO. Identification of Nor-b-Lapachone Derivatives as Potential Antibacterial Compounds against *Enterococcus faecalis* Clinical Strain, **Curr Microbiol.** 62, 684–689 2011.
- FERREIRA, S.B, GONZAGA, D.T.G. SANTOS, W.C. ARAÚJO, K.G.L.; FERREIRA, V.F. β -Lapachona: Sua importância em química medicinal e modificações estruturais. **Rev. Virtual Quim.**, 2, 140-160, 2010.
- FONTANILLES, F. Risks versus benefits in antischistosomal therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 160, 811-820, 1969.
- FOSTER, R. & CHEETHAM, B. L. Studies with the schistosomicide oxamniquine (UK –4271). I: activity in rodents and in vitro. **Transactions of the Royal Soc. of Trop. Medic. and Hygiene**, 67, 674-684, 1973.
- FOSTER, R.A. The preclinical development of oxamniquine. **Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop**, 15, supl. 1:1-9, 1973.
- FROHBERG, H. - Results of toxicological studies on praziquantel. **Drug Res.**, 1137 - 1144, 1984.
- GEWIRTZ, D.A (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. **Biochem Pharmacol** 57:727-741
- GONNERT, R. ANDREWS, P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Parasitology Research**, 52, 129-150, 1977.
- GOULART M. O., PINTO A. V. Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. **Eur J Med Chem.** 46:399-410, 2010.
- GRYSHECK, R. C. B. *et al.* Tratamento da esquistossomose *mansoni* com praziquantel em duas doses únicas diárias consecutivas. **Rev. Soc. Bras. Clin. Med.** 2, 100-102, 2004.
- GRYSEELS, B. *et al.* Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. **Trop. Med. Int. Health.** 6, 864-873, 2001.
- GRYSEELS, B., POLMAN, K., CLERINX, J., KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, 368, 1106–1118, 2006.
- GUISSÉ, F.; POLMAN, K.; STELMA, F. F. Therapeutic evaluation of two different dose regimens of praziquantel in a recent *Schistosoma mansoni* focus in Northern Senegal. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 56, 511-514, 1997.
- GUSTAVSON, S., ZOUAIN, C.S., ALVES, J.B., LEITE, M.F. e GOES, A.M. Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII. **Parasitol Int**, 51, 259-269. 2002.
- HAAS W, HAEBERLEIN S. Penetration of cercariae into the living human skin: *Schistosoma mansoni* vs. *Trichobilharzia szidati*. **Parasitol Res** 05:1061-1066, 2009.
- HAAS, W., HAEBERLEIN, S., BEHRING, S., SCHÖNAMSGRUBER, E., ZOPELLI, E.,. *Schistosoma mansoni*: human skin ceramides are a chemical cue for host recognition of cercariae. **Exp. Parasitol.** 120, 94-97.
- HAEBERLEIN S, HAAS W (2008) Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. **Parasitol Res** 102:657–662, 2008.
- HANG, L.M., WARREN, K.S. e BOROS, D.L. *Schistosoma mansoni*: antigenic secretions and the etiology of egg granulomas in mice. **Exp. Parasitol.**, 35, 288-298. 1974.
- HIRSCH, C., CARVALHO QUEIROZ, C., FRANCO, G.R., PENA, S.D., SIMPSON, A.J. e GOES, A.M. Identification of paramyosin (Sm-97) as a modulating antigen on granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* eggs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 92, 663-667. 1997.

- HOFER, W. Chemistry of metrifonate and dichlorvos. **Acta Pharmacologica et Toxicologia**. 49 S(V): 7-14, 1981.
- HOOKE, S. C. Constitution of lapachol and its derivatives. **J. Chem. Soc. Transactions** 69 1355, 1896.
- HOOKE, S. C. LOMATIOL. Part II. Its Occurrence, Constitution, Relation to and Conversion into Lapachol. Also a Synthesis of Lapachol **J. Am. Chem. Soc.**, 58, 1181, 1936.
- HOOKE, S.C. The constitution of ``lapachic acid`` (lapachol). **J. Chem. Soc.**, 61, 611, 1892.
- HORII, Y., OWHASHI, M., ISHII, A., BANDO, K. e USUI, M. Eosinophil and neutrophil chemotactic activities of adult worm extracts of *Schistosoma japonicum* in vivo and in vitro. **J Parasitol**, 70, 955-961, 1984.
- HUSSAIN H, KROHN K, UDDIN AHMAD V, ABBAS MIANA G, ROBERT GREEN I Lapachol: an overview. **ARKIVOC** 2,145–171, 2007.
- JEZIORSKI, M. C. GREENBERG, R. M. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: potential role in praziquantel action. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 36, 625-632, 2006.
- JORDAN, P.; WEBBE, G. (Ed.). Schistosomiasis: epidemiology, treatment and control. London: **William Heinemann Medical Books**, 361 p. 1982.
- KABATEREINE, N.B, VENNERSVALD B.J, OUMA, J.H, KEMIJUMBI, J, BUTTERWORTH AE, DUNNE D.W. Adult resistance to schistosomiasis mansoni: age-dependence of reinfection remains constant in communities with diverse exposure patterns. **Parasitology**, 118:101-105, 1999.
- KATZ N, CHAVES A, PELLEGRINO P. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. **Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop São Paulo**. 14:397-402, 1972.
- KATZ, N e PELLEGRINO, J. Estudo de alguns aspetos da esquistossomose mansoni em macacos *cebus* pelo método do oograma quantitativo. **Rer. Inst. Med. Trop**, sent-out, 1974.
- KATZ, N. Chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. **Advances in Pharmacology and Cemothrapy**, 14: 1-70, 1977.
- KATZ, N. DIAS, E.P. e ARAÚJO, N. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop**, 7, 381-387, 1973.
- KATZ, N. e PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop.**, 33, 303-308, 2000.
- KATZ, N., PELLEGRINO, J. Estudos de alguns aspectos da esquistossomose mansoni em macacos Cebus pelo método quantitativo. **Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop. de São Paulo**, 16, 245-252, 1973.
- KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Cienc. Cult.**, 55, 38-43, 2003.
- KATZ, N.; DIAS, L. C. S. Esquistossomose mansoni em parasitologia humana e seus fundamentos gerais. **Editora Atheneu**, 1999.
- KATZ, N.; PELLEGRINO, J.; POMPEU-MEMÓRIA, J.M. Quantitative oogram method in Cebus monkeys experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. **The J. of Parasit.**, 52, 917-919, 1966.
- KENNETH, O.E. SENTHIL, P.K. VICTOR, K. GABRIEL, N.F. HENRIETTA, L. MARION, J.J.M. NAMRITA, L. SUNDARABABU, B (2012) Cobalt mediated ring contraction reaction of lapachol and initial antibacterial evaluation of naphthoquinones derived from lapachol. **Med Chem Res** 21:2117–2122
- KIKUTH, W. & GONNERT, R. Experimental studies on the therapy of schistosomiasis. **Ann. Trop. Med. Parasitol**. 42, 256-267, 1948.

- KIM, S.Y., JEOUNG, N.H., OH, C.J. et al. Activation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 prevents arterial restenosis by suppressing vascular smooth muscle cell proliferation. **Circ. Res.** 104, 842– 850, 2009.
- KING CH, DANGERFIELD-CHA M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. **Chronic Illn** 4:65-79, 2008.
- KING CH, DICKMAN K, TISCH DJ. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, 365:1561-1569, 2005.
- KING CH. Toward the elimination of schistosomiasis. **N. Engl. J. Med.**, 360, 106–109, (2009).
- KRAUTZ_PETERSON, G, CAMARGO, S, HUGGEL, K, VERREY, F, SHOEMAKAKER C.B., SKELLY, P.J. Amino acid transport in Schistosomes: Characterization of the permease heavy chain SPRM1hc. **The J. of Biology Chemiistry**, 282, 21767- 21775, 2007.
- KRISHNAN, P., BASTOW, K.F. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by pyranonaphthoquinone derivatives—eleutherin, alpha lapachone, and beta lapachone. **Biochem. Pharm.** 60, 1367–1379, 2000.
- LAMBERT, C.R. Chemotherapy of experimental *S. mansoni* infection with a nitro-thiazole derivative CIBA 32,644-Ba. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 58, 292-303, 1964.
- LAMBERTUCCI J. R. et al. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. **Acta Tropica**, 77, 101-109, 2000.
- LAMBERTUCCI J. R.; SILVA L. C. S.; Voietta I. *Esquistossomose mansônica*. In: **Coura J. R. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1, cap 76, p. 931-946, 2005.
- LI, C.J, ZHANG, L.J, DEZUBE, B.J, CRUMPACKER, C.S, PARDEE, A.B. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. **Medical Sci** 90:1839-1842, 1993.
- LI, C.J., LI, YZ., PINTO, A.V., PARDEE, A.B., Potent inhibition of tumor survival in vivo by b-lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. **PNAS**. 23, 13369–13374, 1999.
- Li, Y.Z., Li, C.J., PINTO, A.V., Pardee, A.B., 1999. Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by beta-lapachone in human carcinoma cells. **Molecular Medicine**. 5, 232-239.
- LIANG, Y. S.; COLES, G. C.; DOENHOFF, M. J. et al. *In vitro* responses of praziquantel-resistant and – susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **Int. J. for Parasitol.**, 31, 1227-1235, 2001.
- LIMA NMF, CORREIA CS, FERRAZ PAL, PINTO AV, PINTO MCRF, SANT’ANA AEG, GOULART MOF. Molluscicidal hydroxynaphthoquinones and derivatives. Correlation between their redox potentials and activity against *Biomphalaria glabrata*. **J Braz Chem Soc** 13:822-829, 2002b.
- LIMA NMF, SANTOS AF, PORFÍRIO Z, GOULART MOF, SANTANA AEG. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotic*. **Acta Tropica** 83:43-47, 2002a.
- LORSUWANNARAT N, SAOWAKON N, RAMASOOTA P, WANICHANON C, SOBHON P. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. **Exp. Parasitol.** 133:18–27, 2013.
- LOURENÇO, A.L., ABREU , P.A., LEAL, B. JÚNIOR , E.N.S., PINTO, A.V., PINTO, M.C.F. R., SOUZA, A.M.T., NOVAIS, J.S., PAIVA, M.B., CABRAL, L.M., RODRIGUES, C.R., VITOR, F. CASTRO, H.C. Identification of Nor-b-Lapachone Derivatives as Potential Antibacterial Compounds against *Enterococcus faecalis* Clinical Strain, **Curr Microbiol.**, 62,684–689, 2011.

- LUTZ, A. Caramujos de água doce do gênero *Planorbis*, observados no Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 10: 65-82, 1918.
- MAGNUSSEN, P. Treatment and re-treatment strategies for schistosomiasis control in different epidemiological settings: a review of 10 years experiences. **Acta Trop.** 86, 243-254, 2003.
- MANGOLD, B.L. DEAN, D.A. Autoradiographic analysis of *Schistosoma mansoni* migration from skin to lungs in naïve mice. Evidence that most attrition occurs after the skin phase. **The American J. of Trop. Med. and Hygiene**, 32:785-789, 1983.
- MARTINEZ, E.M.; NEVES, R.H.; OLIVEIRA, R.M. F. et al. Características biológicas e morfológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 36, 557-64, 2003.
- MARTINEZ, M. J. A.; BENITO, P. B. Biological activity of quinones. **Studies in Natural Products Chemistry**, 30, 303-366, 2005.
- MCKERROW, J. SALTER, J. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. **Trends Parasitol.**, 18, 193-195, 2002.
- MCLAREN, D. J. *Schistosoma mansoni*: The parasite surface in relation to host immunity. **New York**, 1980.
- MEDEIROS, C.S, PONTES-FILHO, N.T, CAMARA, C.A, LIMA-FILHO, J.V, OLIVEIRA, P.C, LEMOS, A.S, LEAL, A.F.G, BRANDÃO, J.O.C, NEVES, R.P (2010) Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. **Braz J Med Biol Res** 43:345-349
- MELO A.L.; COELHO P.M.Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: Neves D.P., **Parasitologia Humana**, 11. ed. São Paulo: Atheneu, cap. 22, 193-212, 2005.
- MELO AL, SILVA-BARCELLOS NM, DEMICHELI C, FREZARD F. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. **Int J Pharm.**, 255:227-230, 2003.
- MENNA-BARRETO, R.F.S, CORRÊA, J.R, PINTO, A.V, SOARES, M.J, CASTRO, S.L. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. **Parasitol Res** 101:895-905, 2007.
- MILLER, F.H. TULLOCH Jr G.S., KUNTZ, R.E. Scanning electron microscopy of integumental surface of *Schistosoma mansoni*. **The J. of Parasit.** 58, 693-698, 1972.
- MILLER, P. WILSON, R. A. Migration of *Schistosoma mansoni* from the lungs to the hepatic portal system. **Parasitology**, 80:267-288, 1980.
- MOON, D.O, KANG, C.H, KIM, M.O, JEON, Y.J, LEE, J.D, CHOI, Y.H., KIM, G.Y. β -Lapachone (LAPA) decreases cell viability and telomerase activity in leukemia cells: suppression of telomerase activity by LAPA. **J. Med. Food.** 13:481-488, 2010.
- MOSMANN, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol Methods** 65:55-63.
- MRAZEK et al., 2003 - MRAZEK, M.F., MOSSIALOS, E. Stimulating pharmaceutical research and development for neglected diseases **Health Policy**, 64, 75-88, 2003.
- MULVENNA J, MOERTEL L, JONES M.K, NAWARATNA S, LOVAS E.M, GOBERT G.N, COLGRAVE M, JONES A, LOUKAS A, MCMANUS D.P. Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument. **Int. J. Parasitol.**, 40, 543-554, 2010.
- MURAY, MT, PIZZORNO JE. **Encyclopedia of natural medicina 2ª ed.** PA4 Rocklin, CA: Prima pub. 967-072, 1998.

NEVES, D.P.; MELO, A.L.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. **Parasitologia humana**, 10^o ed São Paulo: Atheneu, 174- 193, 2000.

NIOI, P, HAYES JD. Contribution of NAD(P)H:quinone oxidoreductase I to protection against carcinogenesis, and regulation of its gene by the Nrf2 basic-region leucine zipper and the arylhydrocarbon receptor basic helix-loop-helix transcription factors. **Mutat. Res.**, 555, 149-171, 2004.

NORDGREN, I., HOLMSTEDT, B., BENGTSSON, FINKEL, Y. Plasma levels of metrifonate and dichlorvos during treatment of schistosomiasis with Bilarcil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 29, 426-430, 1980.

OLIVEIRA, M. F.; LEMOS, TELMA, L. G.; DE MATTOS, M. C.; SEGUNDO, T. A.; SANTIAGO, G. M. P.; BRAZ-FILHO, R. New enamine derivatives of lapachol and biological activity **An. Acad. Bras. Cienc.** 74, 211, 2002.

OLIVEIRA, M.F. et al. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 111:217-221, 2000.

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

PANCRE, V., WOLOWCZUK, I., GUERRET, S., COPIN, M.C., DELANOYE, A., CAPRON, A. e AURIAULT, C. Protective effect of rSm28GST-specific T cells in schistosomiasis: role of gamma interferon. **Infect Immun**, 62, 3723-3730, 1994.

PARK HJ, AHN KJ, AHN SD, CHOI E, LEE SW, ET AL. Susceptibility of cancer cells to b-lapachone is enhanced by ionizing radiation. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, 61, 212–219, 2005.

PATTON, E. A et al. Severe schistosomiasis in the absence of interleukin-4 (IL-4) Is IL-12 independent. **Infection and Immunity**, Washington, 69, 589-592, 2001.

PEARCE EJ, MACDONALD A,S. The immunobiology of Schistosomiasis. **Nat Rev Immunol** 7:499–511, 2002.

PEARCE, E.J. Progress towards a vaccine for schistosomiasis. **Acta Tropica**, 86, 309-313, 2003.

PELLEGRINO J, OLIVEIRA CA, FARIA J, CUNAH 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. **Adv. Parasitol.**, 6, 233-90, 1968.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. **Rev. Brasileira de Malacologia e Doenças Trop.** 8, 589-597, 1956.

PEREIRA, A.S, PADILHA, R.J, LIMA-FILHO, J.L, CHAVES, M.E (2011) Scanning electron microscopy of the human low-density lipoprotein interaction with the tegument of *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res** 109:1395–1402

PÉREZ-SACAU E, ESTÉVEZ-BRAUN A, RAVELO AG, GUTIÉRREZ YAPU D, GIMÉNEZ TURBA A. Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and beta-lapachone. **Chem Biodivers.**, 2, 264-74, 2005.

PHILLIPS SM, DICONZA JJ, GOLD JA, REID WA. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse. I. Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation, and host morbidity. **J. Immunol.**, 118, 594–599, 1977.

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.

- PINTO AV, PINTO MCR, GILBERT B, PELLEGRINO J, MELLO RT. *Schistosoma mansoni* blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: I. Naphthoquinones and derivatives. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 71:133–135, 1977.
- PINTO, C. E ALMEIDA, A.F. Schistosomiasis mansoni no Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 5:287, 1948.
- PRATA, A, BINA, J.C, BARRETO A.C, ALECRIM, M.G. Attempt to control the schistosomiasis transmission by oxamniquine, in an hyperendemic locality. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 22, 65-72, 1980.
- PRATA, A. Esquistossomose mansoni: In: **Veronesi Tratado de Infectologia**. São Paulo: Editora Atheneu. 1996.
- RAGHUNATHAN, R. BRUCKNER, D. Identification of sex in *Schistosoma mansoni* cercariae. **J. Parasit.**, 61, 66-8, 1975.
- RAMALHO-PINTO, F. J. MACLAREN, D.J. e SMITHES, S.R. Complement-mediated killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by rat eosinophils *in vitro*. **Journal of Experimental Medicine**, 147, 147-156, 1978.
- RENSLO, et al., RENSLO, A.R., MCKERROW, J.H., Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nature Chemical Biology**, 2, 12, 2006.
- RESENDES, A.P.C.; SANTOS, R.S.; BARBOSA, C.S.. Internação hospitalar e mortalidade por esquistossomose mansônica no Estado de Pernambuco, Brasil, 1992/2000. **Caderno de Saúde Pública**. 21, 1392-1401, 2005.
- REY, L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomíase: O Parasito. In: **Parasitologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 856, 413-425, 2001.
- RIBEIRO, F., VIEIRA CD CDOS, S., FERNANDES, A., ARAUJO, N. e KATZ, N. The effects of immunization with recombinant Sm14 (rSm14) in reducing worm burden and mortality of mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 35, 11-17, 2002.
- RIBEIRO, K.A.L.; CARVALHO, C.M.; MOLINA, M.T.; LIMA, E.P.; LÓPEZMONTERO, E.; REYS, J.R.M; OLIVEIRA, M.B.F.; PINTO, A.V.; SANT'ANA, A.E.G.; GOULART, M.O.F. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, 111, 44-50, 2009.
- ROGERO, SIZUE OTA; LUGAO, ADEMAR BENÉVOLO; IKEDA, TAMIKO ICHIKAWA AND CRUZ, ÁUREA SILVEIRA. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.** 6, 317-320, 2003.
- ROSS A.G.; BARTLEY P.B.; SLEIGH A.C.; OLDS G. R.; LI W.; WILLIAMS G.M.; MCMANUS D. P.. Schistosomiasis. **The New England Journal of Medicine**, 346, 1212–20, 2002.
- SABAH, A.A., FLETCHER, C., WEBBE, G. DOENHOFF, M.J. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. **Exp. Parasit.**, 61, 294-303, 1986.
- SADUN. E. H., VOX LICHTENBERG, F., CHEEVER, A. W., AND ERICKSON. D. G. Schistosomiasis mansoni in the chimpanzee. The natural history of chronic infections after single and multiple exposures. **American J. of Trop. Med. and Hygiene**, 19, 25-277, 1970.
- SALAS, C, TAPIA, R.A, CIUDAD, K, ARMSTRONG, V, ORELLANA, M, KEMMERLING, U., FERREIRA, J, MAYA J.D, MORELLO, A () *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorg Med Chem** 16:668-674, 2008.

- SANDOVAL NA, RODRIGUEZ C, POCH M, MARTÍNEZ NR. Tumores provocados por metilcolantreno y lapachol. Seguimiento Del desarrollo mediante citologia/Tumors caused by methylcholanthrene and lapachol. Follow-up of desenvolvimento by cytology. **Acta physiol. Pharmacol. Ther latinoam.**, 46, 257-64, 1996.
- SANTOS, A. F.; FERRAZ, A. P. L.; PINTO, A. V. et al. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4 naphthoquinones and derivatives. **Int. J. Parasitol.**, 30, 1199-1202, 2000.
- SANTOS, A.T. et al. Preliminary clinical trials with praziquantel in *Schistosoma japonicum* infections in the Philippines. **Bulletin of the World Health Organization**, 57:793-799, 1979.
- SEUBERT, J. POHLKE. R. LOEBICH, F. Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against *Schistosomes* and cestodes. **Experientia**. 33, 1036-1037, 1977.
- 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. **Parasitology International**, 55, 63-68, 2005.
- SHEKHAR, K .C. Schistosomiasis drugs therapy and treatment considerations. **Practical therapeutics**. 42, 379-405, 1991.
- SHUHUA, X. Development of antischistosomal drugs in China, with particular consideration to praziquantel and the artemisinins. **Acta Tropica**, 96, 153-167, 2005.
- SILVA, L.C. et al. Clinical trials with oral oxamniquine (UK 4271) for the treatment of mansoni schistosomiasis. **Rev. do Inst. de med. Trop. de São Paulo**, 16: 103-109, 1974.
- SILVA, M.N. FERREIRA, V.F. SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase naβ-lapachona e derivados. **Quim. Nova**, 26, 407-416, 2003.
- SILVA, T. M. S.; CAMARA, C. A.; BARBOSA, T. P.; SOARES, A. T.; CUNHA, L. C.; PINTO, A. C.; VARGAS, M. D. Molluscicidal activity of synthetic lapachol amino and hydrogenated derivatives. **Bioorg. Med. Chem.**, 13, 193-196, 2005.
- SITÔNIO, M.M., JÚNIOR, C.H.R.C, CAMPOS, I.A, SILVA, J.B.N.F, LIMA, M.C.A, GÓES, A.J.S, MAIA, M.B.S, ROLIM, P.J.N, SILVA, T.G. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione (b-lapachone). **Inflamm Res**. doi: 10.1007/s00011-012-0557-0, 2012.
- SMITHERS S.R, TERRY R.J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. **Parasitology**, 55, 695–700, 1965.
- SOLANGE, L.C, DENISE, G.J, BATISTA, M.M, BATISTA, W.B, ANISSA, D, ELEN, M.S, RUBEM, F.S.M.B, GABRIEL, M.O, KELLY, S, CRISTIANE, F.S, PATRICIA, B.S, MARIA, N.C.S. Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A Morphological, Biochemical, and Proteomic Overview of Potential *Trypanosoma cruzi* Targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones. **Mol Bio Int**. doi:10.4061/2011/306928, 2011.
- SOUTHGATE, V.R. et al. Studies on the biology of Schistosomiasis with emphasis on the Senegal River Basin. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 96, 75-78, 2001.
- SOUZA, M.A.A, BARBOSA, VS, WANDERLEI, T.N.G e BARBOSA, C.S. Criadouros de *Biomphalaria*, temporários e permanentes, em Jaboatão dos Guararapes, PE, **Rev. da S. Brasileira de Med. Trop**. 41, 252-256, 2008.
- STANDEN, D. The effect of temperature light and salinity upon the hatching of the ova of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 45, 225-241, 1952.

- STEINER, K. et al. The fate of praziquantel in the organism. I Pharmacokinetics in animals. **Eur J Drug Metab Pharmacokinet.** 1, 85-95, 1976.
- STEINMANN, P., KEISER, J., BOS, R., TANNER, M., UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect. Dis.** 6, 411–425, 2006.
- STELMA, F. F.; SOW, S. Efficacy and effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 53, 167-170, 1995.
- STELMA, F.F. SALL, S. DAFF, B. SOW, S. Oxamniquine cures *Schistosoma mansoni* infection in a focus in which cure rates with praziquantel are unusually low. **J. de Infectious Diseases.** 176, 304-307, 1997.
- STIREWALT, M. A. Effect of snail maintenance temperatures on development of *Schistosoma mansoni*. **Exp. Parasitol.**, 3, 504-16, 1954.
- STIREWALT, M. A. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. **Adv Parasitol** [S.I.], v. 12, p. 115-82, 1974.
- STURRCK, R. F. The parasites and their life-cycles. In: JORDAN, P.; WEBBE, G. e STURRCK, R. F. Human Schistosomiasis. Wallingford: **CAB International**, 1993.
- SUN, J. S.; GEISER, A. H.; FRYDMAN, A. H. A Preparative Synthesis of Lapaehol and Related Naphthoquinones. **Tetrahedron Lett.**, 39, 8221, 1998.
- TAGLIARINO, C, PINK, J.J, DUBYAK, G.R, NIEMINEN, A.L, BOOTHMAN, D.A. Calcium is a key molecule in β -lapachone-mediated cell death. **J Bio Chem** 276:19150-19159, 2001.
- TCHUEM TCHUENTE!, L. A., BARRAL, V., IMBERT-ESTABLET, D., MORAND, S., NICOLETTE, R. & JOURDANE, J. *Schistosoma mansoni*: lack of prezygotic reproductive isolation between African and South American strains. **Exp. Parasitol.** 80, 323-327, 1995.
- TEIXEIRA M.J, DE ALMEIDA YM, VIANA JR, HOLANDA FILHA JG, RODRIGUES TP, PRATA JR JR, COÊLHO IC, RAO VS, POMPEU MM. *In vitro* and *in vivo* Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). **Phytother Res.** 15, 44-8, 2001.
- TROPIER, G, CAPRON, A. Receptor for IgG and human beta 2-microglobulin on *Schistosoma mansoni* schistosomula. **Nature** (London), 278, 447-49, 1979.
- UTZINGER J, KEISER J, SHUHUA X, TANNER M, SINGER BH. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. **Antimicrob Agents Chemother.** 47, 1487–1495, 2003.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S., et al., IL-4 influences IL-2 production and granulomatous inflammation in murine schistosomiasis mansoni. **J Immunol**, v.149, n.11, p.3659-3664. 1992.
- VERJOVSKI-ALMEIDA, S., et al., Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nat Genet.**, 35, 148 – 157, 2003.
- WANG W, DAI JR, LI H.J, SHEN X.H, LIANG Y.S. Is there reduced susceptibility to praziquantel in *Schistosoma japonicum*? Evidence from China. **Parasitology.** 137, 1905–1912, 2010.
- WARREN, K.S., DOMINGO, E.O. e COWAN, R.B. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. **Am J Pathol**, 51, 735-756, 1967.
- WEBBE G. JAMES, C. A comparison of the susceptibility to praziquantel of *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. intercalatum* and *S. mattheei* in hamsters. **Parasitology Research**, 52, 169-177, 1977.

- WHO, W. H. O. Schistosomiasis Countries x indicators. v. 2009. n. 12 Novembro.
Genebra:http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sch/db/index.html?units=minimal®ion=all&country=all&countries=all&year=2008,2009b
- WILSON, R. A.; ROLLINSON, D. e SIMPSON, A. J. Cercariae to liver worms: development and migration in the mammalian host. In: **The biology of Schistosomes: from genes to latrines**. Londo: Academic Press, 1987.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. TDR: special program for research and training in tropical diseases. Disponível em: < <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/schistosomiasis> >. Acesso em: 13 out. 2009.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. The control of schistosomiasis: second report of the WHO expert committee. **Technical Report Series.**, 830, 86, 1995.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2008. The Social Context of Schistosomiasis and its Control: An Introduction and Annotated Bibliography. Birgitte Bruun, Jens Aagaard-Hansen.
- WULFF C, HAEBERLEIN S, HAAS W (2007) Cream formulations protecting against cercarial dermatitis by *Trichobilharzia*. *Parasitol Res* 101:91–97
- WYLER, D.J., WAHL, S.M. e WAHL, L.M. Hepatic fibrosis in schistosomiasis: egg granulomas secrete fibroblast stimulating factor in vitro. **Science**, 202, 438-440, 1978.
- WYNN, T.A., CHEEVER, A.W., 1995. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Current Opinion in Immunology*, Philadelphia, 7, 505-511.
- XIAO, S.H., CATTO, B.A. WEBSTER, L.T. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma munsoni* in vitro and in vivo. **J. of Infectious Diseases.**, 151, 1130-1137, 1985.
- ZILTON, A.A., 2005. Regressão da fibrose hepática. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38, 514-520.

3. Hipótese e Modelo teórico

A β -Lap apresenta atividade esquistossomicida *in vitro* e *in vivo* (modelo murino) sobre *S.mansoni*.

- Existem diferenças ultraestruturais no tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* quando são incubados *in vitro* e tratados com β -lap quando comparados aos vermes controles (não tratados).
- A β -lap apresenta atividade esquistossomicida, *in vivo*, sobre o *S. mansoni* na fase de esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens e vermes adultos.

4. DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar a atividade esquistossomicida da β -lapachona, *in vitro* e *in vivo* (modelo murino), sobre *Schistosoma mansoni*.

4.2 Específicos

- Avaliar a atividade esquistossomicida da β -lap *in vitro* sobre vermes adultos de *S. mansoni*.
- Descrever as alterações ultraestruturais tegumentares de vermes adultos de *S. mansoni* quando expostos a β -lap, *in vitro*.
- Avaliar a atividade esquistossomicida da β -lap, *in vivo*, sobre diferentes estágios do *S. mansoni* (esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens e vermes adultos) por meio da quantificação de vermes recuperados, viabilidade de ovos na parede intestinal e quantificação de ovos em tecido hepático.
- Avaliar os parâmetros patológicos e histomorfométricos de tecido hepático de camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com a β -lap.



OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

5. OPERACIONALIZAÇÃO DA PESQUISA

5.1 DESENHO DO ESTUDO

Estudo experimental de intervenção terapêutica que avaliou os efeitos *in vitro* e *in vivo* da β -lapachona sobre o *S. mansoni*. Pesquisas envolvendo a bioprospecção visam à descoberta de novos princípios biologicamente ativos. Neste propósito, a triagem de compostos esquistossomicidas *in vivo* e *in vitro* apresenta uma abordagem inicialmente importante.

Os modelos experimentais animais são extremamente úteis para a melhor compreensão de diversos processos infecciosos (DRUILHE et al., 2002). Na esquistossomose mansônica diversos modelos experimentais já foram utilizados para avaliar a infecção. Desde modelos simples, até os mais complexos para descobrir possíveis controles ou melhores condutas terapêuticas para essa parasitose (CHEEVER et al., 2002). Vários animais têm sido empregados como modelos experimentais na avaliação de drogas esquistossomicidas. Entre eles estão macacos (SADUN et al., 1970), coelhos (ANDRADE et al., 1988) e camundongos (WARREN, 1966, ANDRADE; SILVA; SOUZA, 1997).

O camundongo representa o melhor modelo experimental e o de escolha para o presente trabalho, por desenvolver ciclo biológico semelhante do que ocorre no homem, reproduzir diversos aspectos da doença humana, por desenvolverem um quadro de fibrose hepática semelhante ao que ocorre no homem, ser de fácil manipulação e manutenção e baixo custo. O modelo murino é empregado para esclarecer aspectos que não podem ser investigados em seres humanos, por questões éticas e operacionais. A linhagem de escolha foi *Swiss*, frequentemente utilizada, pois apresenta variabilidade genética o que facilita extrapolar os resultados para os seres humanos e neste animal as dificuldades de realização por questões éticas são menores.

Os ensaios *in vitro* apresentam vantagens em relação aos *in vivo* por limitar as variáveis experimentais, obter dados mais facilmente, além do período de teste ser, em muitos casos, mais curto. A grande problemática dos ensaios *in vitro* é a extrapolação dos resultados para outros modelos experimentais e ensaios clínicos, uma vez que os testes são realizados em sistemas fechados. Nos estudos esquistossomicidas *in vitro*, o emprego de cultura de vermes adultos é utilizado com sucesso, pois é reprodutível, rápido, sensível e financeiramente acessíveis para a execução. Estes ensaios permitem avaliar a viabilidade de vermes adultos, a

capacidade reprodutiva por meio de acasalamento e ovoposição e os efeitos no tegumento do parasito.

Os animais foram mantidos nas mesmas condições ambientais e alimentares. E as culturas dos vermes seguindo o mesmo protocolo experimental. Desta forma, qualquer diferença existente entre os grupos (experimentais e controles) foi atribuída à intervenção terapêutica.

5.2 Categorizações das variáveis

5.2.1 Variáveis independentes

Nome	Definição conceitual	Definição operacional	Categorização
Susceptibilidade dos camundongos a infecção pelo <i>S. mansoni</i> .	Capacidade dos camundongos serem infectados pelo <i>S. mansoni</i> .	Presença de ovos de <i>S. mansoni</i> eliminados juntos com as fezes, segundo o método de Kato-Katz.	- Infectados - Não infectados

5.2.2 Variáveis dependentes

Nome	Definição conceitual	Definição operacional	Categorização
Susceptibilidade <i>in vivo</i> do <i>S. mansoni</i> a drogas esquistossomicidas.		Recuperação de vermes através da técnica de perfusão (Pellegrino, Siqueira, 1956).	Média±DP
Alteração no padrão de ovoposição.	Avaliação do potencial de ovoposição das fêmeas.	Através do método de oograma avaliação dos estádios evolutivos dos ovos em tecido intestinal.	Alterado Não alterado
		Segundo técnica de digestão de tecido hepático po hidróxido de potássio (Cheever, 1968).	Média±DP
Análise histopatológica	-	Estudos patológicos das secções de tecido hepático	Análise descritiva

Análise histomorfométrica	-	Diâmetro médio dos granulomas esquistossomóticos distribuídos em tecido hepático.	Média±DP
		Número médio de granulomas esquistossomóticos distribuídos em tecido hepático.	
Susceptibilidade <i>in vitro</i> do <i>S. mansoni</i> a drogas esquistossomicidas.	Avaliação esquistossomicida de drogas frente a vermes de <i>S. mansoni</i>	Cultura de vermes <i>S. mansoni</i> em meio RPMI.	Percentual de mortalidade. Score de motilidade.
Avaliação Ultraestrutural	Análise em microscopia eletrônica de varredura	Avaliação das alterações tegumentares.	Análise descritiva das alterações de acordo com o grupo controle e teste.

5.3 Animais

A pesquisa foi iniciada após aprovação (23076.020127/2010-47) pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. Foram utilizados camundongos Swiss webster (*Mus musculus*) fornecidos e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). Os animais foram alojados em gaiolas, mantidas nas mesmas condições ambientais (temperatura ambiente de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro), camas de maravalha (anteriormente autoclavada) e livre acesso a ração para camundongos (Labina®/Purina, São Paulo-SP) e água estéril *ad libitum*.

Utilizamos a cepa de *S. mansoni*, Belo Horizonte – Minas Gerais (BH) mantida no Laboratório de Esquistossomose Experimental do LIKA através da passagem sucessiva da cepa em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* mantidos no Departamento de Medicina Tropical da UFPE.

5.4 Infecção de caramujos, obtenção das cercárias e infecção dos camundongos

Para infecção dos hospedeiros intermediários, fezes de camundongos infectados (camundongos de manutenção) foram coletadas e tratadas de acordo com a técnica de sedimentação espontânea. Após sucessivas lavagens do material fecal em água desclorada, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento distribuído em placas de Petri, que foram expostas à iluminação artificial (lâmpadas elétricas) e a temperatura de 28°C por aproximado de 50 minutos, tempo necessário para liberação dos miracídios que são visualizados com auxílio de lupa. Os caramujos foram expostos individualmente em contato com miracídios (n=8), permanecendo exposto à luz artificial e ao calor 28°C por aproximadamente duas horas. Posteriormente, os moluscos foram transferidos para aquários com água desclorada e livres de exposição luminosa (STANDEN, 1952).

Para cada ciclo de infecção, 80 moluscos foram expostos à infecção, a fim de obter equilíbrio entre os sexos do parasito (PELLEGRINO, KATZ, 1968). Decorridos 35 a 40 dias de infecção, os moluscos foram expostos à luz e à temperatura de 28°C por cerca de 40-60 min., em recipientes de vidro, com H₂O destilada, para permitir a liberação de cercárias. (STIREWALT, 1954). Após a obtenção de uma suspensão cercariana, os camundongos foram infectados por via percutânea (OLIVIER, STIREWALT, 1952) com uma fração desta suspensão, que contenha, em média, 50 cercárias, para os experimentos *in vivo* e 120 cercárias para os experimentos *in vitro*.

5.5 Compostos

β-lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona), foi sintetizado a partir do lapachol, derivado natural obtido de *T. avellanedae* (Bignoneaceae), segundo Cavalcante e colaboradores (2008). Praziquantel foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil).

5.6 Susceptibilidade *in vitro* e análise ultraestrutural de vermes machos de *S. mansoni*

O procedimento experimental recomendado para avaliação da suscetibilidade *in vitro* do *S. mansoni* está de acordo com trabalhos desenvolvidos por Barth e colaboradores (1996a, 1996b).

5.6.1 Tratamento *in vitro* de *S. mansoni* frente a β-Lap e Praziquantel

Após 60 dias de infecção os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e posteriormente perfundidos com salina estéril (0.9% NaCl) o sistema porta-hepático e vasos mesentéricos para recuperação dos vermes (DUVALL, DEWITT, 1967). Todos os vermes coletados foram imediatamente transferidos para placas de Petri contendo meio de cultura RPMI 1640 suplementado com HEPES 20 mM, 100 µg / mL de penicilina, 100 µg de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino e lavados duas vezes com este meio. Então, os vermes foram distribuídos (dois machos por poço) em placas de cultura estéreis com 24 poços de 35mm de diâmetro contendo 2mL do mesmo meio suplementado. Posteriormente, os vermes foram incubados para adaptação em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C. Duas horas após incubação, β-lap foi adicionado a uma concentração final de 50 ou 100 µM (a partir de uma solução-mãe de 1 mM em sulfóxido de RPMI 1640/1.5% dimetilsulfóxido (DMSO)). Vermes controles foram incubados em 1,5% de DMSO em meio RPMI 1640 suplementado, esse grupo de vermes foi considerado como controle negativo. Outros vermes foram incubados em 1,5% de DMSO em meio RPMI 1640 suplementado e adicionado 10 µM PZQ, esse grupo de vermes foi considerado como controle positivo (figura 1).

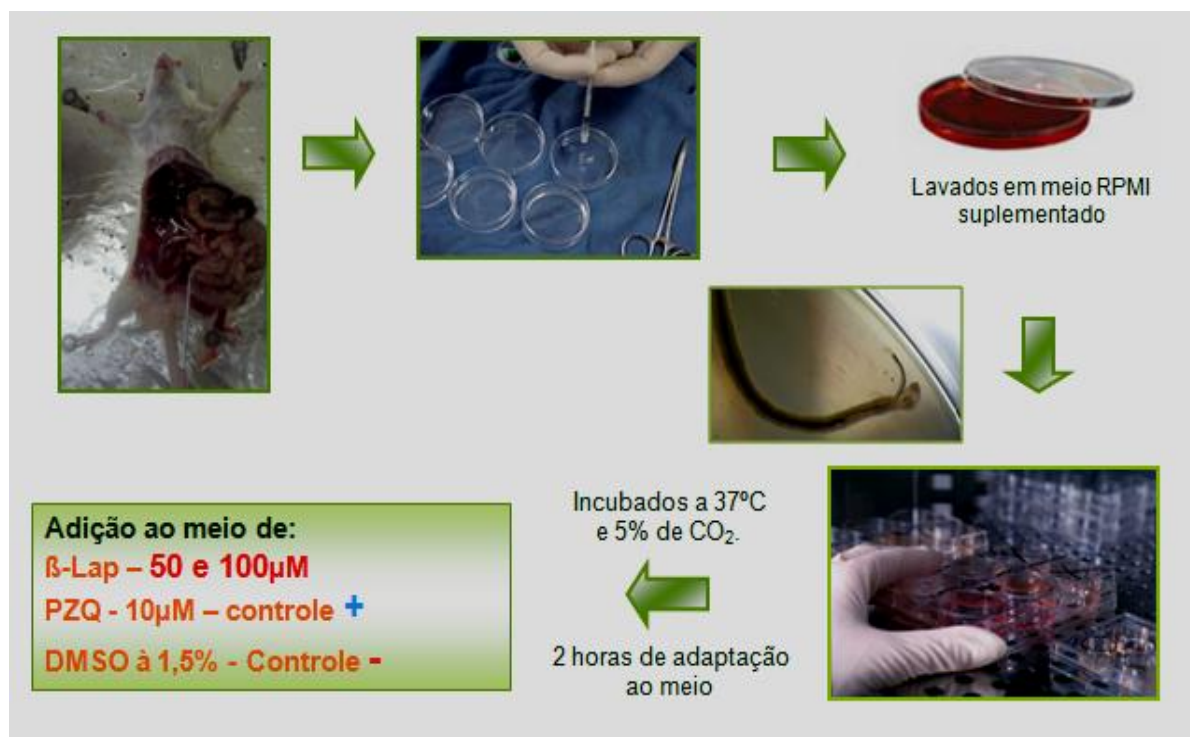


Figura 1. Esquema de cultura, de vermes adultos de *S. mansoni*, em meio RPMI.

Todos os experimentos foram realizados seis vezes. Um microscópio invertido foi utilizado para avaliar as condições gerais de vermes incluindo a motilidade, alterações no tegumento e sobrevivência monitorizada aos 3, 6, 18 e 24 horas de cultura.

5.6.2 Critérios de avaliação esquistossomicidas

O verme foi considerado morto quando não apresentava nenhum movimento durante 2 minutos de observação. A motilidade do verme foi classificada de acordo com um sistema de pontuação em uma escala de 0-3 de acordo com a viabilidade dos movimentos do verme proposto por Horiuchi e colaboradores (2005). O sistema de pontuação é o seguinte: 3, movimento corporal completa; 1.5, o movimento do corpo parcial (extremidades) ou imóvel, mas vivo (leves ondas peristálticas) e 0, morto.

5.6.3 Microscopia de Varredura

Os vermes foram fixados (glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2) por 12 horas em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavados no mesmo tampão e pós-fixadas em OsO₄ a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2, por 1 hora a temperatura ambiente. Após a pós-fixação, o material foi lavado no mesmo tampão, desidratado em séries crescentes de etanol e posteriormente secado em CO₂ líquido na secadora criticalpoint (modelo Hitachi HCP-2, Hitachi, Japão). Após a montagem e metalização os vermes foram observados e fotografados no microscópio eletrônico de varredura JEOL - JSM 5600LV.

5.7 Susceptibilidade in vivo de diferentes estágios evolutivos do *S. mansoni* frente a β -Lap

O procedimento experimental recomendado e utilizado neste trabalho para avaliação da suscetibilidade *in vivo* do *S. mansoni* está de acordo com os trabalhos desenvolvidos por Pellegrino e Faria (1965), Katz e colaboradores (1966) e Katz e Pellegrino (1973).

5.7.1 Formações dos grupos experimentais e tratamento

Camundongos fêmeas Swiss, 30 dias de idade (~30g) foram infectados e distribuídos aleatoriamente em grupos com 10 animais, a fim de avaliar a eficácia da β -lap contra diferentes estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*. A terapia foi iniciada no 1º, 14º, 28º e 45º dias de infecção para avaliar as seguintes fases: esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens (antes de oviposição) e vermes adultos (após a oviposição), respectivamente. O tratamento foi realizado durante 5 dias consecutivos, via intraperitoneal na concentração de 50mg/kg/dia. β -lap foi ressuspensa em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 1% de Tween 80 e diluídas em solução salina. Cada grupo experimental tratado com β -lap foi acompanhado por um grupo de controle que recebeu o veículo da droga. Todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical 60 dias após a infecção (figura 2).

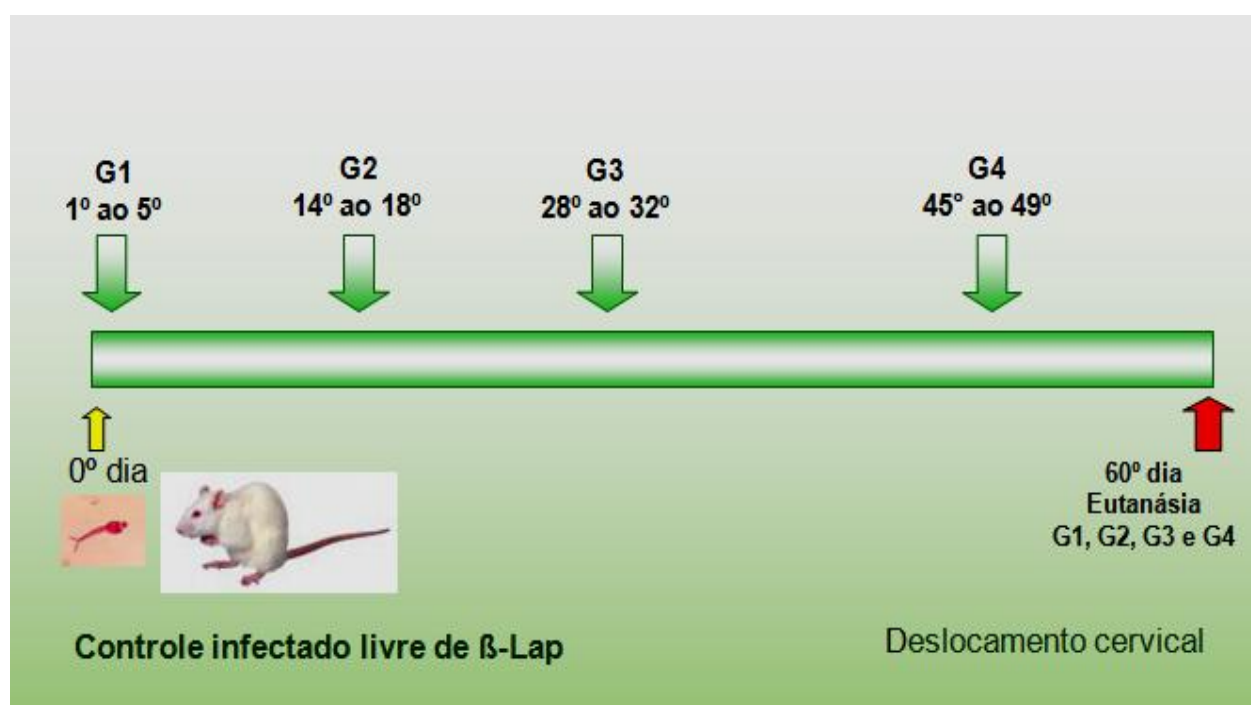


Figura 2. Esquema da formação dos grupos experimentais.

Todos os grupos experimentais foram formados com base em trabalhos científicos que analisaram atividade de drogas esquistossomicidas em diferentes fases do desenvolvimento do *S. mansoni* em modelo murino (BARTH et al., 1996; EL-RIDI et al., 1997; BARBOSA et al., 1978, JORDAN, WEBBE, 1982, MARTINEZ et al., 2003).

5.7.2 Parâmetros parasitológicos

Recuperação dos vermes

Após eutanásia, foi efetuada incisão próxima aos órgãos genitais, com auxílio de pinças e tesouras cirúrgicas, indo até a caixa torácica, posteriormente realizada perfusão do sistema venoso portal através da injeção de solução salina (cloreto de sódio a 0,85% e citrato de sódio 1,5%), na veia cava inferior (PELLEGRINO; SIQUEIRA, 1956). A mesma solução foi injetada na aorta descendente, procedendo-se à perfusão das veias mesentéricas (DUVALL; DE WITT, 1967). Ao final foi realizada a quantificação dos vermes adultos machos e fêmeas.

A percentagem de redução do número de vermes após o tratamento foi calculado como segue:

$$\% \text{ de redução} = C - V / C \times 100.$$

Onde:

C = o número médio de parasitas obtidos a partir de animais infectados não tratados.

V = número médio de parasitas obtidos a partir de animais tratados.

Oograma

Três fragmentos (1 cm cada) da porção média do intestino delgado foram removidos e empregados para avaliar o desenvolvimento de maturação dos ovos de *S. mansoni* de acordo com os estudos de Pellegrino et al. (1962). Os ovos encontrados foram contados e classificados em seus diferentes estágios de desenvolvimento e ovos mortos, segundo critérios propostos por Pellegrino e colaboradores (1962).

Quantificação de ovos em tecido hepático

Para estimar o número de ovos por grama de tecido hepático, um fragmento de 0,3 gramas deste tecido foi removido da parte central do lóbulo direito de cada animal e processada individualmente segundo técnica de digestão hepática em hidróxido de potássio (KOH) descrita por Cheever (1968).

5.7.3 Estudo histopatológico e histomorfometria do tecido hepático

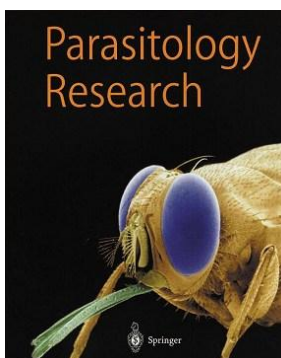
Para cada camundongo perfundidos, uma amostra de tecido hepático foi removida da parte central do lobo lateral esquerdo e fixada em formol tamponado (10%). Posteriormente, as amostras foram embebidas e emblocadas em parafina para obtenção de secções histológicas (5µm) coradas com hematoxilina e eosina.

Dez campos aleatórios por amostra histológica foram empregados para a contagem do número médio de granulomas e avaliação histopatológica por microscopia de luz. Vinte granulomas por animal contendo um único ovo central foram selecionados aleatoriamente e empregados para determinar o diâmetro médio de granulomas, medindo dois diâmetros perpendiculares o nível médio transmiracidal do ovo (Phillips et al. 1977). As imagens foram obtidas usando um microscópio óptico acoplado a uma câmera digital e sistema de computador (Imagens Motic Plus 2.0 MLTM). Todas as avaliações foram realizadas por observadores ``duplo-cegos``.

5.7.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 3.02. Os dados foram expressos como a média $\pm$ DP. Todas as variáveis foram comparadas pelo teste *t* de Student. Em todos os casos, os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

6. Primeiro artigo original submetido à Parasitology Research



Análise ultraestrutural dos danos induzidos pela β -Lapachona na superfície da membrana de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* cepa BH

André de Lima Aires^a,

Eulalia Camelo Pessoa Azevedo Ximenes^b,

Renata Alexandre Ramos Silva^a,

Alexandre José da Silva Góes^b,

Christina Alves Peixoto^c,

Valdênia Maria Oliveira Souza^a,

Mônica Camelo Pessôa de Azevedo Albuquerque^{a*}

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^bCentro de Ciências Biológicas - Departamento de antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^cCentro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Biologia Celular Ultraestrutura, CPqAM/FIOCRUZ, Recife, Pernambuco 50670-420, Brazil.

Resumo

Esquistossomose é uma das doenças tropicais mais negligenciadas, uma vez que não existe vacina disponível e seu controle e tratamento dependem do uso de uma única droga, o praziquantel (PZQ). A β -lapachona (β -lap), análogo do lapachol, composto obtido das cascas de árvores da família *Bigoniaceae* e *Verbenaceae* foi inicialmente desenvolvida como droga anti-tumoral e em vários estudos envolvendo seres humanos e animais experimentais têm apresentado inúmeras propriedades biológicas. O presente estudo fornece, pela primeira vez, conclusões sobre as propriedades esquistossomicida *in vitro* de β -lap. Adultos machos de *S. mansoni*, cepa BH, foram utilizados para o estudo. Mortalidade, motilidade e alterações no tegumento observadas por microscopia eletrônica de varredura foram utilizadas como parâmetros esquistossomicida. Alterações na motilidade foram observadas após seis horas de incubação nas concentrações de 100 μ M e 50 μ M de β -lap. A mortalidade nestas concentrações foi de 100% e 67%, respectivamente, após 24 horas. A morte do parasita foi precedida por progressivo dano na superfície da membrana, caracterizado por descamação do tegumento, redução dos espículos, formação de bolhas, ruptura e o aparecimento de erosões na superfície tegumentar. Além disto, na porção anterior, intenso edema generalizado, áreas de rachaduras com superfície rugosa, sulcos e aparente fibrose, também foram visualizadas. O número de parasitas mortos foi concentração e tempo dependentes. Os resultados do presente estudo proporcionam bases para futuros estudos que visem elucidar as propriedades esquistossomicida de β -lap, tanto em laboratório quanto no campo.

Keywords β -lapachona, *Schistosoma mansoni*, análise Ultraestrutural, tegumento.

Introdução

A esquistossomose, doença causada por vermes trematódeos do gênero *Schistosoma*, é considerada uma das mais prevalente e debilitante doença negligenciada em áreas tropicais e subtropicais, sendo endêmica em aproximadamente 78 países e territórios, que afeta mais de 207 milhões de pessoas em todo o mundo. Cerca de 800 milhões de pessoas habitam áreas de constante risco de infecção e 500 mil morrem a cada ano devido à doença. Tipicamente, a patologia resulta de uma reação inflamatória granulomatosa desencadeada em resposta ao acúmulo de ovos do parasita no fígado e outros tecidos do hospedeiro (Gryseels et al. 2006).

Apesar de muitas pesquisas já realizadas, ainda não existem vacinas eficazes contra doenças parasitárias. O tratamento é ainda o método mais eficiente (Date et al. 2007). O praziquantel (PZQ) é, neste momento, a única droga utilizada para o tratamento e controle da esquistossomose (Doenhoff et al. 2009). Embora seja seguro e eficaz, é preocupante que um único medicamento esteja disponível para tratar uma doença que afeta milhões de pessoas, especialmente desde que cepas de *Schistosoma* estão desenvolvendo baixa sensibilidade e/ou resistência ao PZQ (Abdul Ghani-et al. 2009). Portanto, o uso generalizado de PZQ em zonas endêmicas, com a possibilidade do surgimento de cepas de *Schistosoma* resistentes, combinados a falta de outra droga anti-Schistosoma eficaz, requer o desenvolvimento de novos compostos esquistossomicida (Bertão et al. 2012).

As quinonas constituem uma ampla e variada família de metabólitos encontrados na natureza. Em termos de estrutura molecular, são divididas de acordo com o tipo de sistema aromático que sustenta o anel quinonoídico: benzoquinonas – um anel benzênico; naftoquinonas - um anel naftalênico; antraquinonas - um anel antracênico linear ou angular. β -lapachona (β -lap, Figura 1) (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona, C₁₅H₁₄O₃, MM 242,3), é uma naftoquinona lipofílica, análogo semi-sintético do lapachol obtido a partir das cascas de árvores das famílias *Bignoniaceae* e *Verbenaceae* comumente encontrados em muitas regiões do Brasil. Particularmente no Brasil, seu extrato é amplamente utilizado na medicina popular há séculos para controlar várias doenças (Pinto et al. 1977; Schaffner-Sabba et al. 1984).

O presente estudo investigou, *in vitro*, as propriedades esquistossomicidas de β -lap sobre vermes adultos machos de *S. mansoni*. Neste estudo demostramos e descrevemos, empregando microscópio eletrônico de varredura, os danos induzidos por β -lap sobre a membrana do verme. Além disso, o dano à membrana foi capaz de causar morte aos vermes.

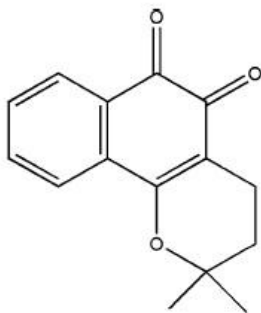


Fig 1. Estrutura química da β -lapachona

Compostos orto-naftoquinonas e derivados foram inicialmente investigados no final dos séculos XIX e início XX pelo químico Samuel Hooker. β -Lap tem sido encontrada como constituinte minoritário durante o isolamento de outras naftoquinonas do cerne de árvores ipê (Diaz e Medina, 1996). Em larga escala, β -Lap pode ser produzida seguindo o método desenvolvido, pela primeira vez, por Hooker e colaboradores através de ciclização do lapachol em ácido sulfúrico por ataque nucleofílico do oxigênio na cadeia lateral isoprenil e purificação mediante recristalizações adicionais (Hooker 1892 e 1896). O produto final são cristais aciculares, laranja-avermelhado e visível a olho nu (Hooker 1936; Sun, Geiser e Frydman 1998).

β -lap foi relatada por apresentar propriedades anti-Trypanosoma cruzi (Menna-Barreto et al. 2007; Salas et al 2008; Ferreira et al. 2011) antimalárica (Andrade-Neto 2004; Pérez-Sacau et al. 2005), anti-inflamatório (Sitônio et al. 2012), antibacteriana (Coelho et al 2010; Lourenço et al 2011), antifúngica (Medeiros et al. 2010.) e antiviral (Schuerch e Wehrli 1978; Li et al. 1993). Não existem dúvidas que suas propriedades antineoplásicas têm gerado as maiores expectativas em sua molécula. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que β -lap inibe tumores resistentes a terapias convencionais, particularmente os neoplasmas de proliferação com ciclo celular lento, tais como próstata, pâncreas, cólon, ovário e mama (Park et al. 2005; Suzuki et al. 2006; Moon et al. 2010).

No que diz respeito às propriedades anti-*Schistosoma mansoni* das naftoquinonas, Pinto e colaboradores (1997) avaliaram os efeitos tópicos de alguns dos seus derivados, incluindo β -lap, no bloqueio da penetração de cercarias em camundongos. Outros estudos envolvendo o controle da esquistossomose usando derivados naphthoquinonas incluem a inibição da glicólise aeróbica em adultos de *S. mansoni* (Edingl, Tersan e Waite 1947), atividade moluscicida contra o caramujo adulto e massas de ovos de caramujos *Biomphalaria glabrata* (hospedeiro intermediário de *S. mansoni*) e atividade contra cercárias (cercárias de *S. mansoni*) (Lima et al. 2002, Camara et al. 2008; Ribeiro et al. 2009).

Materiais e métodos

Compostos

β -lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona), foi sintetizada a partir do lapachol derivado natural obtido de *T. avellanae* (Bignoneaceae) utilizando ácido sulfúrico de acordo com um método desenvolvido por Cavalcante e colaboradores (2008). Praziquantel foi adquirido da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Brasil).

Considerações éticas, animais e infecção

Após a aprovação do Comitê de Ética em Experimentos com Animais da UFPE (23076.020127/2010-47), dez camundongos Swiss com trinta dias de vida, pesando 28 ± 2 g, foram percutaneamente infectados (Olivier e Stirewalt, 1952) com aproximadamente 120 cercárias de *S. mansoni* (cepa BH). Esta cepa é mantida de acordo com procedimentos padrões de criação (Boissier e Mone 2001) no Laboratório de Esquistossomose Experimental do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami-LIKA/UFPE e Departamento de Medicina Tropical da UFPE. Os camundongos foram obtidos e mantidos no biotério do LIKA em ambiente controlado (temperatura entre $20 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclo de 12 horas de luz ao dia), livre acesso à comida (Labin[®]/Purina, São Paulo-SP) e água ad libitum.

Tratamento *in vitro* do *S. mansoni* frente à β -Lap e praziquantel

Sessenta dias após a infecção, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e os vermes assepticamente recuperado por perfusão do sistema portal e veias mesentéricas com solução salina estéril (NaCl a 0,9% w/v) (Smithers e Terry, 1965). Vermes machos foram imediatamente transferidos para meio RPMI 1640 suplementado com 20 mM HEPES, 100 $\mu\text{g/mL}$ de penicilina, 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal e lavados duas vezes com este meio. Os vermes foram distribuídos (dois vermes por poço) em placas de cultura com 24 poços com 2 ml (por poço) do meio suplementado e as culturas incubadas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Duas horas após incubação, para permitir a adaptação dos vermes ao meio de cultura, β -lap foi adicionada nas concentrações de

50 e 100 μM (a partir de uma solução-estoque de 1 mM em RPMI 1640 suplementado e 1,5% de dimetilsulfóxido (DMSO)). Vermes incubados em 1,5% de DMSO em meio RPMI 1640 suplementado serviram com grupo controle negativo. Vermes incubados em 10 μM de PZQ serviram como controle positivo. Todos os experimentos foram realizados seis vezes. Um microscópio invertido foi utilizado para avaliar as condições gerais dos vermes incluindo a motilidade, alterações no tegumento e sobrevivência monitorizada nos tempos de 3, 6, 18 e 24 horas de cultura.

CrITÉRIOS de avaliação esquistossomicidas

O tratamento foi considerado letal quando os vermes não exibiam nenhum tipo de movimento após observação de 2 minutos. A motilidade dos vermes foi pontuada após o tratamento com β -Lap e PZQ de acordo com os critérios de viabilidade marcados numa escala de 0-3 proposto por Horiuchi e colaboradores (2005). Resumidamente o sistema de pontuação é o seguinte: 3, movimento corporal completo; 1,5, movimento parcial do corpo ou imóvel, mas o verme ainda vivo e 0, morto.

Microscopia de Varredura

As amostras foram fixadas (glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2) por 12 horas em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas no mesmo tampão e pós-fixadas em OsO_4 a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2, por 1 hora a temperatura ambiente. Após a pós-fixação, o material foi lavado no mesmo tampão, desidratado em séries crescentes de etanol e posteriormente secado em CO_2 líquido na secadora criticalpoint (modelo Hitachi HCP-2, Hitachi, Japão). Após a montagem e metalização as amostras foram observadas e fotografadas no microscópio eletrônico de varredura JEOL - JSM 5600LV.

Resultados

β-lap altera a motilidade de vermes adultos de S. mansoni

Durante todos os intervalos de observações (3, 6, 18 e 24 horas), os vermes adultos de *S. mansoni* livres de exposição às drogas (grupo controle negativo) exibiram movimentos peristálticos e ondas características ao longo de todo o corpo, ventosas em movimento constante, e ocasionalmente, aderidas ao fundo da placa de cultura (score = 3). PZQ, a droga anti-*Schistosoma* de escolha (grupo controle positivo), causou perda imediata de motilidade dos vermes deixando-os nitidamente reduzidos. Este efeito persistiu e se tornou mais forte com o passar do tempo, dando ao verme a forma de meia-lua. Após 24 h de exposição 83% dos vermes estavam mortos (score = 0) e 17% apresentaram ligeiros movimentos da extremidade posterior e ventosa oral (score = 1,5). A motilidade dos vermes machos de *S. mansoni* diminuiu quando exposto a β-lap, e isto foi concentração e tempo de incubação depende. Após 18 horas, 83% dos vermes expostos a 50 μM de β-lap exibiram redução na motilidade, comprometimento do movimento peristáltico e da capacidade das suas ventosas em aderir ao fundo das placas de cultura (score = 1,5), e depois de 24 horas, 67% dos vermes estavam mortos (score = 0). Quando expostos a 100 μM de β-lap a motilidade dos vermes foi alterada após 6 horas de incubação. Nesta mesma concentração, a mortalidade dos vermes foi observada após 18 horas e todos os vermes foram classificados como mortos após 24 horas (Tabela 1).

Tabela 1 Scores de motilidade de vermes tratados com praziquantel (PZQ) e β-lapachona (β-lap) em diferentes horas pós-incubação.

Grupos	Percent of worms (%) in motility scores after incubation											
	3 h			6 h			18 h			24 h		
	3	1.5	0	3	1.5	0	3	1.5	0	3	1.5	0
Controle	100			100			100			100		
PZQ		100			100			25	75		17	83
β-lap												
50μM	100			75	25		17	83			33	67
100μM	100			42	58			75	25			100

3, movimento de corpo inteiro, 1,5, movimento de apenas uma parte do corpo ou imóvel, mas não mortos; 0, morto.

Análise ultraestrutural dos danos à superfície de *S. mansoni* induzidos pela β -lap

Os vermes adultos de *S. mansoni* incubados durante 18h em meio RPMI 1640 suplementado e 1,5% DMSO apresentaram estrutura de superfície e topografia intactas (Fig. 2 a-c). A superfície do *Schistosoma* macho apresentava canal ginecóforo (Fig. 2a), uma dobra longitudinal na porção posterior que abriga a fêmea e auxilia o acasalamento e reprodução. A porção anterior é caracterizada por um tegumento cilíndrico e liso, uma ventosa oral e uma ventosa ventral com numerosas papilas cilíndricas (Fig. 2b). Com maior ampliação da região médio-dorsal, visualizamos nos vermes um grande número de tubérculos com espinhos típicos, além disso, papilas ciliadas, papilas em forma de cúpula e tegumentares com dobras arranjadas paralelamente também foram observados (Fig. 2c).

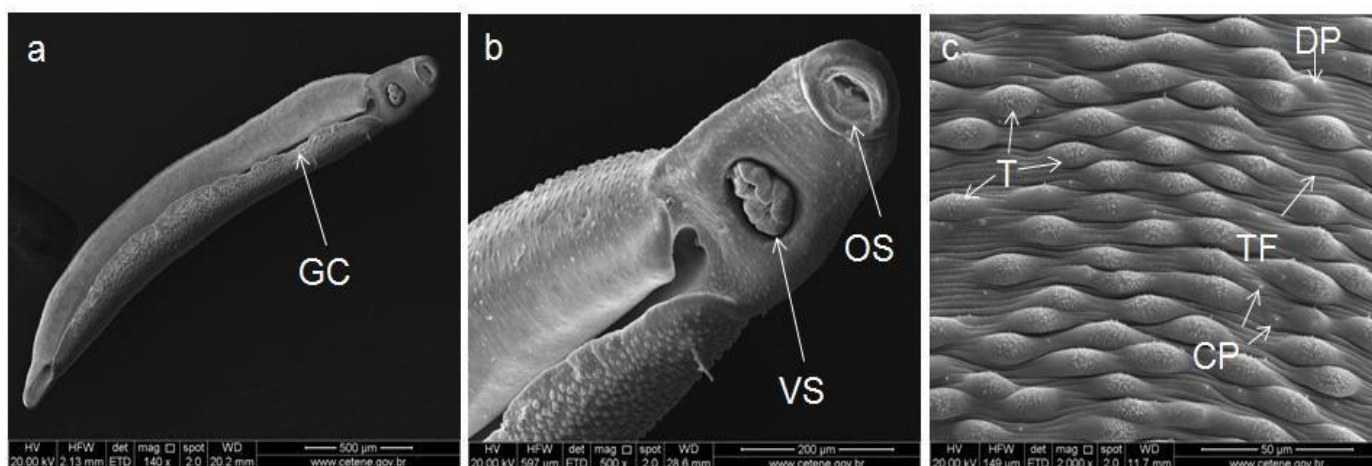


Fig. 2 a-c Microscopia eletrônica de varredura (MEV) do tegumento dos vermes adultos machos *S. mansoni* do grupo controle negativo. Parasitos incubados em meio de manutenção por 18 h; (a, $\times 140$) mostrando canal ginecóforo (GC), (b, $\times 500$) porção anterior mostrando ventosa oral ou acetábulo (OS) e ventosa ventral (VS), (c, $\times 2000$), região dorsal onde tubérculos (T), papilas ciliadas (CP), papilas em forma de cúpula (DP) e dobras tegumentares paralelas (TF) são visíveis.

As alterações causadas pelas doses de 50 e 100 μ M de β -lap sobre vermes adultos machos em 3, 6 e 18 horas são exibidas nas figuras 3 (a-i) e 4 (a-i), respectivamente. β -lap causou claro efeito sobre a musculatura dos vermes, com evolução de curvatura dorsoventral na concentração de 50 μ M (Fig. 3 - a, d, e g). Este efeito foi mais acentuado na concentração de 100 μ M, onde os vermes exibiram forte curvatura dorsoventral, de forma tempo dependente,

assumindo a forma de saca-rolhas após 18 h de incubação (Fig. 4 – a, d, e g). Após 3 h de incubação em 50 μ M de β -lap foram observadas bolhas e lesões focais no tegumento na região anterior dos vermes (Fig. 3b) e pequenas bolhas surgiram na superfície do tegumento do verme formando lesões focais como uma massa (Fig. 3c). Após 6 h de incubação lesões focais em várias partes do corpo se tornaram mais evidente. Observamos lesões em torno da ventosa oral (Fig. 3e) e na porção lateral dorsal do tegumento, espículos reduzidos e erosão de tubérculos (Fig. 3f).

Em 18 h após a incubação, houve edema generalizado na porção anterior e extensas áreas de rachaduras e bolhas (Fig. 3 h). Alterações graves no tegumento caracterizadas por edema, deslocamento e erosão dos tubérculos, perda de espículas e alargamento das pregas arranjadas paralelamente também foram observadas (Fig. 3 i).

As alterações mais significativas na porção anterior do tegumento dos vermes são alcançadas quando incubados em 100 μ M de β -lap. Nesta dose ocorreu evolução intensa do edema e curvatura originando uma superfície enrugada, sulcos evidentes e aspecto fibroso ao longo do tempo de incubação (Fig. 4 - b, e, h). Por 3 h após a incubação, o tegumento tinha tubérculos rachado e perda de espículas (Fig. 4 c). Depois de 6 h, existiam varias bolhas, erosões no tegumento com exposição do tecido subtegumentar.

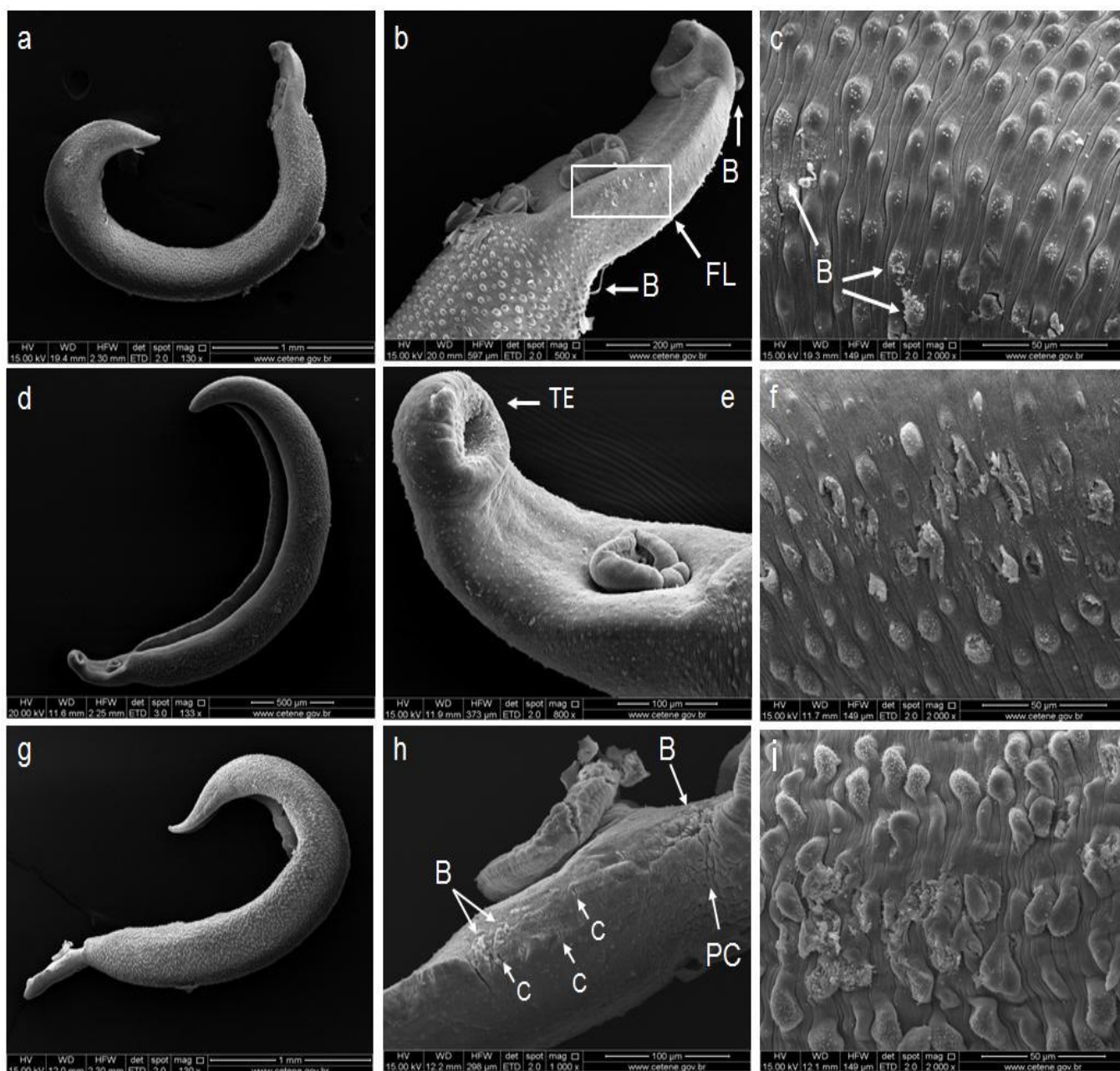


Fig. 3 imagens de MEV de vermes adultos machos de *S. mansoni* exposto a 50 μ M de β -lap. Em 3h (a, x130) mostra curvatura dorsoventral (b, x500) vista ampliada de a mostrando região anterior com bolhas e lesão focal (FL) no tegumento; (c, x2000) superfície dorsal mostrando algumas pequenas bolhas como uma massa (B); em 6 h (d, x133) vermes dorsoventralmente encurvado como em a; (e, x800) vista ampliada da porção anterior de d mostrando a erosão do tegumento (TE) em torno da ventosa oral; (f, x2000) lesões do tegumento dorsal lateral, mostrando a erosão de tubérculos; em 18 h (g, x130) mostra verme com maior curvatura dorsoventral do que em a e d; (h, x1000), parte anterior do tegumento edemaciado, profundas dobras coalescidas (PC) áreas com rachaduras (C) e formação de bolhas (B), (i, x2000) tegumento com erosão de tubérculos e perda de espículos.

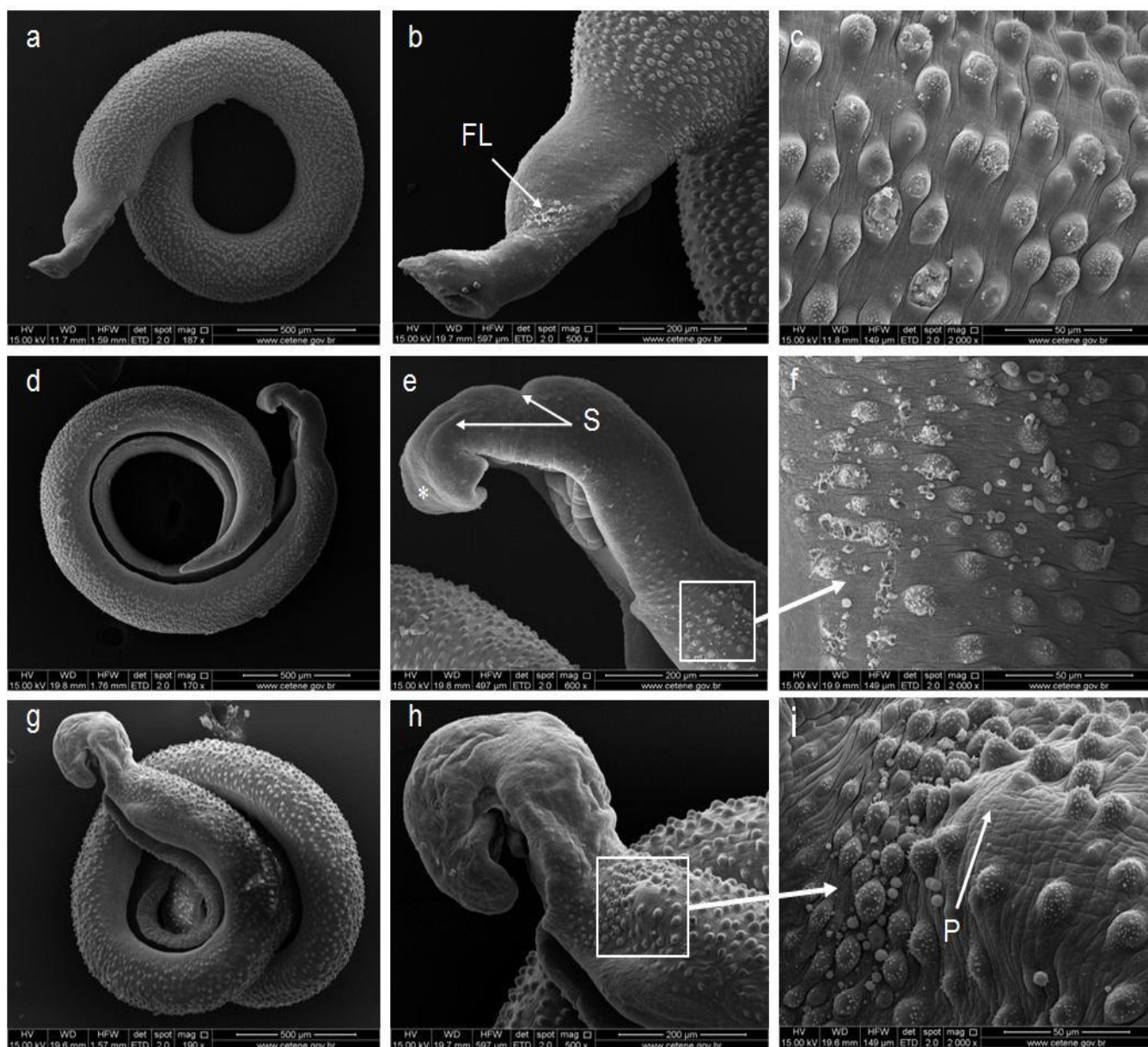


Fig. 4 imagens de MEV de vermes adultos machos de *S. mansoni* exposto a 100 μ M de β -lap. (a, x187) (d, x170) (g, x190) os vermes curvam-se para formar, em g, uma forma em espiral. Em 3 h (a, x 187), o verme enrolado dorsoventralmente, (b, x500) vista ampliada de uma porção anterior do tegumento mostrando edema e lesão focal (FL), (c, x2000) tubérculos danificados, com perda de espículas e exposição do tecido subtegumental; em 6 h (d, x170) verme exibindo contração mais intensa do que em a; (e, x600) vista ampliada de d mostrando contração da porção anterior (*), tegumento edemaciado, presença de sulcos (S) e danos na parte lateral dorsal do tegumento; (f, x 2000) visão ampliada de e mostrando camada subtegumental e presença de bolhas; (h, x500) visão ampliada da porção anterior de g severamente contraída com tegumento inchado mostrando sulcos; (i, x2000) vista ampliada de h mostrando tegumento dorsal lateral com presença de várias bolhas (B) e uma área com evidente protuberância (P).

Após 3 h de incubação com 10 μ M PZQ (droga anti-*Schistosoma*), uma evidente contração longitudinal dos músculos ocorreu; os vermes estavam curvos e encurtados (Fig. 5-a). O efeito do PZQ após 6 h de incubação foi marcado pela perda de tubérculos e espículos, bolhas e surgimento de erosões sobre a superfície do tegumento (Fig. 5 b, c).

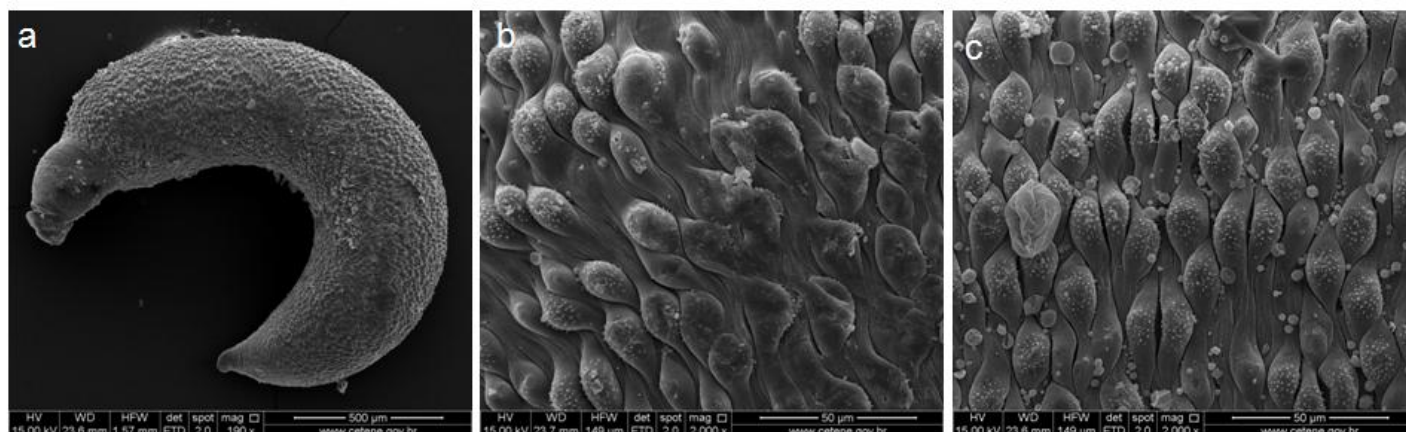


Fig. 5 imagens de MEV de vermes adultos machos de *S. mansoni* expostos a 10 μ M de PZQ. Em 3 h (a, x190) mostrando verme severamente contraído e encurtado; em 6 h (b, x 2000) tubérculos com perda de espículas e aparecimento de erosões no tegumento; (c, x2000) bolhas sobre a superfície do tegumento com tubérculos justapostos.

Discussão

Uma a cada trinta pessoas é portadora de esquistossomose ao redor do mundo (Chitsulo, Loverde e Engels, 2004). A extrema pobreza, ignorância dos riscos, inadequada ou falta total de unidades de saúde públicas somadas às condições insalubres em que milhões de pessoas vivem diariamente, contribuem para o risco de infecção (Fenwick et al. 2003). Este quadro fez King e colaboradores (2005) referirem à esquistossomose como uma pandemia, e responsabilizá-la por 2-15% do subdesenvolvimento dos indivíduos infectados (King et al. 2005).

O praziquantel (PZQ) encontra-se no mercado há mais de 40 anos e é, atualmente, a única droga de escolha para o tratamento da esquistossomose (Doenhoff et al. 2009). Apesar de ser seguro e eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma*, seu uso intenso em áreas endêmicas sinaliza o surgimento de cepas resistentes. Isso tem gerado preocupação na comunidade médica e levou o Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais a incentivar a

descoberta e desenvolvimento de novos compostos esquistossomicidas. Como resultado, vários estudos têm investigado novos compostos tanto *in vivo* como *in vitro* (Abdul-Ghani et al. 2009).

β -lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona; β -lap) é uma quinona de ocorrência natural isolada de *Tabebuia avellanedae* (cujo nome popular é Ipê roxo), uma planta da família Bignoneaceae comumente encontrados em muitas regiões do Brasil. A característica mais importante desta molécula é sua propriedade antitumoral *in vitro* e *in vivo* contra diferentes linhagens de células (Park et al. 2005; Suzuki et al 2006. Moon et al. 2010). Na clínica, algumas drogas antitumorais (dactinomicina, doxorubicina, bleomicina e mitomicina C) apresentam grupamento quinona e isto reforça a importância deste grupo químico para o desenvolvimento de novas drogas antineoplásicas e para outras enfermidades (Gewirtz, 1999; Galm et al. 2005; Zhang 2006; Dong et al. 2009).

Nos ensaios *in vitro*, rotineiramente utilizados na triagem de novos compostos com potencial esquistossomicida, o tegumento do verme é alvo importante de observação devido ao contato direto com os compostos. O tegumento do *S. mansoni* é uma barreira que o isola do meio externo e garante manutenção das funções vitais. Ele é responsável pela absorção de nutrientes, metabolismo de lipídios e colesterol, proliferação e reparo tecidual, além da absorção seletiva de drogas. Essas características reforçam a importância de estudos sobre o tegumento do *S. mansoni*, pois esta estrutura é importante alvo de ação de drogas esquistossomicidas (Krautz_Peterson et al 2007; Faghiri e Skelly 2009; Pereira et al. 2011). Hipotetizamos que β -lap pode exibir propriedades esquistossomicida por interferindo a estabilidade da membrana e a integridade estrutural do tegumento de *S. mansoni*. Para testar esta hipótese, primeiro estabelecemos a concentração de β -lap capaz de causar morte ao verme adulto, no intervalo de 24h de incubação *in vitro*. Para essa triagem empregamos o teste de citotoxicidade de MTT (Mosmann 1983). Com base no tempo de exposição e o teste de MTT, as concentrações de 50 μ M e 100 μ M foram empregadas para estudar a capacidade da β -lap em alterar a motilidade e induzir lesões no tegumento de vermes adultos.

O presente estudo utilizou a linhagem BH, nativa de Minas Gerais, Brasil. Esta cepa predomina nas regiões endêmicas no Brasil, que apresenta cerca de 25 milhões de pessoas em risco constante de infecção e outras seis milhões infectadas em todo o Brasil, país do continente americano com o maior número de infecções (Lambertucci 2010). Avaliamos as alterações ultraestruturais em vermes adultos os machos, pois as fêmeas sexualmente maduras, não entram

em contato direto com o micro-ambiente do hospedeiro, e alterações no tegumento são mais acentuados nos vermes machos (Nahed, Riad e Yomna 2009; Mostafa Soliman e 2002; Manneck, Haggenmuller e Keiser 2010).

Este é o primeiro relato do efeito anti-helmíntico de β -lap sobre vermes adultos machos de *S. mansoni*. No presente estudo, o dano na superfície da membrana e o número de parasitas mortos foram dose e tempo dependente. A Tabela 1 e Figuras 3 e 4 ilustram os graves danos à superfície do *Schistosoma* adultos induzidos pelo tratamento com β -lap. O teste de mobilidade, foi semelhante ao indicado pelo teste citotóxico de MTT, que indicou aumento no número de parasitas mortos de forma concentração e tempo dependentes ao tratamento com β -lap.

As alterações na motilidade teve início após 6 horas de incubação nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M de β -lap (tabela 1). No entanto, a mortalidade total dos vermes ocorreu 24 horas após tratamento na concentração de 100 μ M de β -lap. Neste mesmo intervalo de tempo 67% dos vermes evoluíram para a morte na concentração de 50 μ M. β -lap causou paralisia e forte curvatura dorsoventral, além de dano progressivo na superfície de membrana, caracterizado por redução de espinhos, descamação e erosão, formação de bolhas e ruptura, com aparecimento de lesões originando aparência fibrosa, mas os vermes não foram encurtados como aqueles expostos ao PZQ. As alterações tegumentares descritas no presente estudo são semelhantes às encontradas em vermes adulto de *S. mekongi* tratados com artesunato (Jiraungkoorskul et al. 2005), *S. haematobium* tratado com atorvastatina combinada a acetato de medroxiprogesterona (Soliman Ibrahim & 2005) e de *S. mansoni* expostos ao artemether (Xiao et al. 1995) ou PZQ (Xiao et al 1995; Xiao et al. 2000; Lorsuwannarat et al. 2013).

Apesar de extensamente estudado, o exato mecanismo de ação desta droga ainda não é completamente elucidado. No entanto, sabe-se que primeiramente, PZQ causa rápido influxo de cálcio, que leva a contração muscular espasmódica no verme. Em segundo lugar, o tegumento do verme sofre grande destruição, resultando na morte do parasita (Doenhoff et al. 2008 e 2009). No caso da exposição a β -lap, o progressivo dano na superfície de membrana parece não estar diretamente relacionado com o influxo do cálcio, uma vez que β -lap inibe o influxo de Ca^{2+} e causa efluxo deste íon, sugerindo que o aumento de Ca^{2+} no plasma seja responsável pela apoptose causada por β -lap (Tagliarino et al. 2001; Bentle et al. 2006.).

Recentemente, 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona, conhecido como plumbagina provou ser ativo contra vermes adultos de *S. mansoni*, alterando a motilidade e tegumento que levaram a

morte dos parasitos. Os efeitos da plumbagina sobre *S. mansoni* também foram dose e tempo dependentes e a superfície dos parasitos machos pareceu ser mais fortemente danificados pelas drogas do que do sexo feminino (Lorsuwannarat et al. 2013). As alterações no tegumento induzidas pela plumbagina incluem edema, rachaduras e superfície rugosa com sulcos e aparência fibrosa. Estas alterações são semelhantes às observadas no nosso estudo utilizando β -lap (Fig. 3 b, e, h Fig. 4 b, e, h).

Naftoquinonas, incluindo β -lap têm mostrado ser ativos contra outras fases no desenvolvimento de *S. mansoni*. Pinto e colaboradores (1997) avaliaram derivados naftoquinonas que inibissem topicamente a penetração de cercárias de *S. mansoni*. Nesta experiência, os 23 derivados avaliados, 15 bloquearam a penetração das cercárias quando aplicados na cauda de camundongos 24 horas antes da infecção via caudal. Ainda neste experimento, o grupo de animais expostos a β -lap resultou em 100% de bloqueio, o que significa que não houve vermes recuperados. Os autores concluem que os derivados de naftoquinonas bioativos podem ser empregados como fármacos profiláticos em regiões endêmicas (Pinto et al. 1997). Vários estudos têm apontado a importância de formulações tópicas que são capazes de bloquear a penetração da cercária (Pinto et al. 1997; Wulff, Haeberlein e Hass 2007; Hass e Haeberlein 2009; Kasny et al. 2007), desde que a infecção pelo *S. mansoni* depende da penetração e adaptação adequada nos primeiros 4-5 dias nos estratos da pele do hospedeiro definitivo (Brachs e Haas 2008; Haeberlein e Hass 2008). Além disso, derivados naftoquinonicos também são ativos contra hospedeiro intermediário do *S. mansoni*. Estes compostos matam caramujos adultos e desova de *B. glabrata* (Dos Santos et al. 2000; Lima et al, 2002a; Lima et al, 2002b; Camara et al. 2008; Ribeiro et al. 2009).

β -lap, como outras naftoquinonas, depois de sofrer redução enzimática *in situ* (ciclo redox) podem produzir espécies reativas de oxigênio (EROS) ($O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, 1O_2) (Solange et al. 2011.). Assim, β acelera a hipóxia em células tumorais e em microrganismos através da produção de ânion superóxido, aumento da peroxidação lipídica, desorganização proteica (Melissa et al. 2007; Pinto e Castro 2009; Bey 2007; Salas et al. 2008) e inativando as enzimas topoisomerase I (Boothman, Trask e Pardee 1989) e II (Krishnan e Bastow 2000). No entanto, o mecanismo de ação da β -lap sobre o *S. mansoni* ainda não é compreendido.

In vitro β -lap induz a formação de peróxido de hidrogênio, disfunção mitocondrial e fragmentação de DNA, além de causar alterações ultraestruturais em epimastigotas e

trípomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Menna-Barreto 2007; Salas et al. 2008). β -lap apresenta propriedades antimaláricas *in vitro* e *in vivo* contra cepas que são sensíveis e resistentes à cloroquina (Andrade-Neto 2004; Pérez-Sacau et al. 2005). As propriedades antifúngicas de β -lap na infecção disseminada por *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* em camundongos imunossuprimidos com dexametasona foram investigadas por Medeiros e colaboradores (2010). Neste estudo, a carga fúngica foi reduzida até 104 vezes no pulmão, cérebro, baço e fígado. Além disso, β -lap tem demonstrado atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Kenneth et al. 2012) e inibir a replicação do vírus HIV-1, da transcriptase reversa do vírus da mieloblastose aviária, leucemia murina de Rauscher e da α -polimerase de DNA (Schuerch e Wehrli 1978; Li et al. 1993).

Novas drogas com potenciais propriedades anti-*S. mansoni* estão sendo identificadas todos os dias e muitas vezes servem como modelos para possíveis alterações moleculares que resultam em compostos mais eficazes e menos tóxicos. O presente estudo é o primeiro a apresentar o *S. mansoni* como um novo alvo para β -lap. Demonstramos a susceptibilidade de vermes adultos de *S. mansoni* da linhagem BH, porém uma investigação detalhada será necessária para compreender os mecanismos moleculares relacionados à atividade anti-*Schistosoma* de β -lap para estabelecer este medicamento como parte do arsenal disponível de compostos esquistossomicida.

Agradecimento: Este trabalho recebeu suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq - Brasil, Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (FACEPE) and Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

References

1. Abdul-Ghani RA, Loutfy N, Hassan A (2009) Experimentally promising antischistosomal drugs: a review of some drug candidates not reaching the clinical use. *Parasitol Res* 105:899-906
2. Andrade-Neto VF, Goulart MOF, Silva-Filho JF, Silva MJ, Pinto MCFR, Pinto AV, Zalis MG, Carvalho LH, Krettli AU (2004) Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. *Bioorg Med Chem Lett* 14:1145–1149
3. Bentle MS, Reinicke KE, Bey EA, Spitz DR, Boothman DA (2006) Calcium-dependent modulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair. *J Biol Chem* 281:33684-33696
4. Bertão HG, Silva RAR, Padilha RJR, Albuquerque MCPA, Gandhi Rádis-Baptista (2012) Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Parasitol Res* 110:2465-2473
5. Bey EA, Bentle MS, Reinicke KE, Dong Y, Yang CR, Girard L, Minna JD, Bornmann WG, Gao J, Boothman DA (2007) An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by beta-lapachone. *Proc Natl Acad Sci USA* 28:11832-11837
6. Boissier J, Mone H (2001) Male-female larval interactions in *Schistosoma mansoni* infected *Biomphalaria glabrata*. *Int J Parasitol* 31:352–358
7. Boothman DA, Trask DK, Pardee AB (1989) Inhibition of Potentially Lethal DNA Damage Repair in Human Tumor Cells by β -Lapachone, an Activator of Topoisomerase I. *Cancer Res* 49:605-612
8. Brachs S, Haas W (2008) Swimming behaviour of *Schistosoma mansoni* cercariae: responses to irradiance changes and skin attractants. *Parasitol Res* 102:685–690
9. Camara CA, Silva TMS, Silva TG, Martins RM, Barbosa TP, Pinto AC, Vargas MD (2008) Molluscicidal activity of 2-hydroxy-[1,4]naphthoquinone and derivatives. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 80:329-334
10. Cavalcante FA, Silva JLV, Carvalho VMN, Camara CA, Silva TM, Pinto AC, et al. (2008) Spasmolytic activity of lapachol and its derivatives, alpha and beta-lapachone, on the guinea-pig ileum involves blockade of voltage-gated calcium channels. *Rev Bras Farmacog* 18:183–189
11. Chitsulo L, Loverde P, Engels D (2004) Schistosomiasis. *Nat Rev Microbiol* 2: 12–13.
12. Coelho TS, Silva RS, Pinto AV, Pinto MC, Scaini CJ, Moura KC, Almeida da Silva P (2010) Activity of β -lapachone derivatives against rifampicin-susceptible and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 90:293-297
13. Date AA, Joshi MD, Patravale VB (2007) Parasitic diseases: liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59:505–521
14. Diaz F, Medina JD (1996) Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea* spp. *J Nat Prod* 59:423-424
15. Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J (2008) Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis* 21:659-667

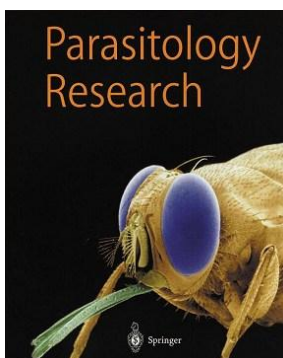
16. Doenhoff MJ, Hagan P, Cioli D, Southgate V, Pica-Mattoccia L, Botros S, Coles G, Tchuem Tchuente LA, Mbaye A, Engels D (2009) Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology* 136:1825–1835
17. Dong Y, Chin SF, Blanco E, Bey EA, Kabbani W, Xie XJ, Bornmann WG, Boothman DA, Gao J (2009) Intratumoral delivery of beta-lapachone via polymer implants for prostate cancer therapy. *Clin Cancer Res* 15:131-139
18. Dos Santos AF, Ferraz PAL, Pinto AV, Pinto MCRF, Goulart MOF, Sant'Ana AEG (2000) Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. *Int J Parasitol* 30:1199-1202
19. Edingl E, Tersan A, Waite JF (1947) Effect of 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone on Glycolysis of *Schistosoma mansoni*. *Proc Soc Exp Biol Med* 64:111-113
20. Faghiri Z, Skelly PJ (2009) The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake *FASEB J* 23:2780–2789
21. Fenwick A et al (2003). Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends parasitol* 19:509–15
22. Ferreira SB, Salomão K, Silva FC, Pinto AV, Kaiser CR, Pinto AC, Ferreira VF, Castro SI (2011) Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone analogues. *Eur J Med Chem* 46:3071–3077
23. Galm U, Hager MH, Van Lanen SG, Ju H, Thorson JS, Shen B (2005) Antitumor Antibiotics: Bleomycin, Eneidynes, and Mitomycin. *Chem Rev* 105:739-758
24. Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57:727-741
25. Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L (2006) Human schistosomiasis. *Lancet* 368:1106–1118
26. Haas W, Haeberlein S (2009) Penetration of cercariae into the living human skin: *Schistosoma mansoni* vs. *Trichobilharzia szidati*. *Parasitol Res* 05:1061-1066
27. Haeberlein S, Haas W (2008) Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitol Res* 102:657–662
28. Hooker SC (1892) The Constitution of ``Lapachic Acid`` (Lapachol) and Derivatives. *J Chem Soc* 61:611-650
29. Hooker SC (1896) The Constitution of lapachol and its derivatives. The Structure of the Amylene Chain. *J. Chem. Soc.* 69:1355
30. Hooker SC (1936) The constitution of lapachol and its derivatives. The structure of Paterno's isolapachol. *J Am Chem Soc* 59:1190-1195
31. Horiuchi A, Satou T, Akao N, Koike K, Fujita K, Nikaido T (2005) The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. *Vet Parasitol* 129:83–87
32. Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Sobhon P, Riengrojpitak S, Kangwanrangsang N (2005) Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. *Parasitol Int* 54:177–183
33. Kasny M, Mikes L, Dalton JP, Mountford AP, Horak P (2007) Comparison of cysteine peptidase activities in *Trichobilharzia regenti* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 134:1599–1609

34. Kenneth OE, Senthil PK, Victor K, Gabriel NF, Henrietta L, Marion JJM, Namrita L, Sundarababu B (2012) Cobalt mediated ring contraction reaction of lapachol and initial antibacterial evaluation of naphthoquinones derived from lapachol. *Med Chem Res* 21:2117–2122
35. King CH, Dangerfield-Cha M (2008) The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic Illn* 4:65-79
36. King CH, Dickman K, Tisch DJ (2005) Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet*, 365:1561-1569
37. Krautz-Peterson G, Camargo S, Huggel K, Verrey F, Shoemaker CB, Skelly PJ (2007) Amino acid transport in Schistosomes: Characterization of the permease heavy chain SPRM1hc. *The Journal of Biological Chemistry* 282:21767- 21775
38. Krishnan P, Bastow KB (2000) Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by Pyranonaphthoquinone derivatives – Eleutherin, α lapachone and β lapachone. *Biochemical Pharmacology* 60:1367-1379
39. Lambertucci JR (2010) Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 105:422-435
40. Li CJ, Zhang LJ, Dezube BJ, Crumpacker CS, Pardee AB (1993) Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Medical Science* 90:1839-1842
41. Lima NMF, Correia CS, Ferraz PAL, Pinto AV, Pinto MCRF, Sant’Ana AEG, Goulart MOF (2002b) Molluscicidal hydroxynaphthoquinones and derivatives. Correlation between their redox potentials and activity against *Biomphalaria glabrata*. *J Braz Chem Soc* 13:822-829
42. Lima NMF, Santos AF, Porfírio Z, Goulart MOF, Santana AEG (2002a) Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotic*. *Acta Tropica* 83:43-47
43. Lorsuwanarat N, Saowakon N, Ramasoota P, Wanichanon C, Sobhon P (2013) The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 133:18–27
44. Lourenço AL, Abreu PA, Leal B, da Silva Júnior EN, Pinto AV, Pinto Mdo C, Souza AM, Novais JS, Paiva MB, Cabral LM, Rodrigues CR, Ferreira VF, Castro HC (2011) Identification of nor- β -lapachone derivatives as potential antibacterial compounds against *Enterococcus faecalis* clinical strain. *Curr Microbiol* 62:684-689
45. Manneck T, Haggemüller Y, Keiser J (2010) Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni* *Parasitology* 137:85–98
46. Medeiros CS, Pontes-Filho NT, Camara CA, Lima-Filho JV, Oliveira PC, Lemos AS, Leal AFG, Brandão JOC, Neves RP (2010) Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. *Braz J Med Biol Res* 43:345-349
47. Melissa SB, Kathryn ER, Ying D, Erik AB, David AB (2007) Nonhomologous End Joining Is Essential for Cellular Resistance to the Novel Antitumor Agent, B-Lapachone. *Cancer Res* 67:6936- 6945

48. Menna-Barreto RFS, Corrêa JR, Pinto AV, Soares MJ, Castro SL (2007) Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. *Parasitol Res* 101:895–905
49. Moon DO, Kang CH, Kim MO, Jeon YJ, Lee JD, Choi YH, Kim GY (2010) β -Lapachone (LAPA) decreases cell viability and telomerase activity in leukemia cells: suppression of telomerase activity by LAPA. *J Med Food* 13:481–488
50. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55–63
51. Mostafa OM, Soliman MI (2002) Experimental use of black-seed oil against *Schistosoma mansoni* in albino mice: II. Surface topography of adult worms. *Egypt J Med Lab Sci* 11:79–85
52. Nahed HA, Riad HAT, Yomna IM (2009) Effects of garlic on albino mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*: A parasitological and ultrastructural study *Trop Biomed* 26:40–50
53. Olivier L, Stirewalt MA (1952) An efficient method for exposure of mice to cercariae of *S.mansoni*. *Journal of Parasitology* 38:19–23
54. Park HJ, Ahn KJ, Ahn SD, Choi E, Lee SW, et al (2005) Susceptibility of cancer cells to β -lapachone is enhanced by ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61:212–219
55. Pereira AS, Padilha RJ, Lima-Filho JL, Chaves ME (2011) Scanning electron microscopy of the human low-density lipoprotein interaction with the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 109:1395–1402
56. Pérez-sacau E, Estévez-braun A, Ravelo AG, Gutiérrez YD, Giménez TA (2005) Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and beta-lapachone. *Chem Biodivers* 2:264–74
57. Pinto AV, Castro SL (2009) The Trypanocidal Activity of Naphthoquinones: A Review. *Molecules* 14:4570–4590
58. Pinto AV, Pinto MCR, Gilbert B, Pellegrino J, Mello RT (1997) *Schistosoma mansoni* blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: I. Naphthoquinones and derivatives. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71:133–135
59. Ribeiro KAL, Carvalho CM, Molina MT, Lima EP, Lópezmontero E, Reys JRM, Oliveira MBF, PintoAV, Sant’ana AEG, Goulart MOF (2009) Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica* 111:44–50
60. Salas C, Tapia RA, Ciudad K, Armstrong V, Orellana M, Kemmerling U, Ferreira J, Maya JD, Morello A (2008) *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg Med Chem* 16:668–674
61. Schaffner-Sabba K, Schmidt-Ruppin KH, Wehrli W, Schuerch AR, Wasley JW (1984) beta-Lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. *J Med Chem* 27:990–994

62. Schuerch AR, Wehrli W (1978) β -Lapachone, an Inhibitor of Oncornavirus Reverse Transcriptase and Eukaryotic DNA Polymerase- α . *Eur J Biochem* 84:197-205
63. Sitônio MM, Júnior CHRC, Campos IA, Silva JBNF, Lima MCA, Góes AJS, Maia MBS, Rolim PJN, Silva TG (2012) Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione (b-lapachone). *Inflamm Res*. doi: 10.1007/s00011-012-0557-0
64. Smithers SR, Terry RJ (1965) The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 55:695–700
65. Solange LC, Denise GJ, Batista MM, Batista WB, Anissa D, Elen MS, Rubem FSMB, Gabriel MO, Kelly S, Cristiane FS, Patricia BS, Maria NCS (2011) Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A Morphological, Biochemical, and Proteomic Overview of Potential *Trypanosoma cruzi* Targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones. *Mol Bio Int*. doi:10.4061/2011/306928
66. Soliman MF, Ibrahim MM (2005) Antischistosomal action of atorvastatin alone and concurrently with medroxyprogesterone acetate on *Schistosoma haematobium* harboured in hamster: surface ultrastructure and parasitological study. *Acta Trop* 93:1–9
67. Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J (2006) Schistosomes and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet Infectious Diseases* 6:411-425
68. Sun JS, Geiser AH, Frydman AH (1998) A preparative synthesis of lapachol and related naphthoquinones. *Tetrahedron Lett* 39:8221-8224
69. Suzuki M, Amano M, Choi J, et al. (2006) Synergistic effects of radiation and beta-lapachone in DU-145 human prostate cancer cells *in vitro*. *Radiat Res* 165:525-531
70. Tagliarino C, Pink JJ, Dubyak GR, Nieminen AL, Boothman DA (2001) Calcium is a key molecule in β -lapachone-mediated cell death. *J Bio Chem* 276:19150-19159
71. Wulff C, Haeberlein S, Haas W (2007) Cream formulations protecting against cercarial dermatitis by *Trichobilharzia*. *Parasitol Res* 101:91–97
72. Xiao SH, You JQ, Yang YQ, Wang CZ (1995) Experimental studies on early treatment of schistosomal infection with artemether. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 26:306–318
73. Xiao S, Shen B, Chollet J, Utzinger J, Tanner M (2000) Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harbored in mice treated with artemether. *J Parasitol* 86:1125–1132
74. Zhang G, Fang L, Zhu L, Zhong Y, Wang PG, Sun D (2006) Syntheses and biological activities of 3'-azido disaccharide analogues of daunorubicin against drug-resistant leukemia. *J Med Chem* 49:1792-1799

6. Primeiro artigo original submetido à Parasitology Research



Ultrastructural analysis of β -Lapachone-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms

André de Lima Aires^a,

Eulalia Camelo Pessoa Azevedo Ximenes^b,

Renata Alexandre Ramos Silva^a,

Alexandre José da Silva Góes^b,

Christina Alves Peixoto^c,

Valdênia Maria Oliveira Souza^a,

Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque^{a*}

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

^bCentro de Ciências Biológicas - Departamento de antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^cCentro de Pesquisas Aggeu Magalhães – Departamento de Biologia Celular Ultraestrutura, CPqAM/FIOCRUZ, Recife, Pernambuco 50670-420, Brazil.

Abstract

Schistosomiasis is one of the most neglected tropical diseases, since no vaccine is available and treatment and control depend on the use of a single drug, praziquantel. First developed as anti-tumor drug, β -lapachone (β -lap) is an analog of a lapachol compound obtained from the bark of trees of the families *Bigoniaceae* and *Verbenaceae*. Several studies involving humans and experimental animals have reported numerous biological properties of β -lap. The present study provides, for the first time, conclusions on the *in vitro* schistosomicidal properties of β -lap. Adult male *S. mansoni* worms of the BH strain were used for the study. Motility, mortality and alterations in the tegument observed using scanning electron microscopy were employed as schistosomicidal parameters. Alterations in motility were observed six hours after incubation in concentrations of 100 μ M and 50 μ M of β -lap. Mortality at these concentrations was 100% and 67%, respectively after 24 hours. The death of the parasite was preceded by progressive surface membrane damage, characterized by tegument peeling, spine reduction and erosion, blister formation and rupture, and the emergence of holes. In addition to this, in the anterior portion, intense general edema, areas of cracking with a wrinkled surface, furrows and a fibrous appearance were also observed. The number of dead parasites following β -lap treatment depended on concentration and time. The results of the present study thus provide a sound basis for further in-depth studies of the schistosomicidal properties of β -lap, both in the laboratory and in the field.

Keywords β -lapachone, *Schistosoma mansoni*, Ultrastructural analysis, tegument

Introduction

Human schistosomiasis, a disease caused by trematode worms of the genus *Schistosoma*, is considered one of the most prevalent and debilitating neglected diseases in tropical and subtropical areas, being endemic to approximately 78 countries and territories and affecting more than 207 million people worldwide. About 800 million people live in areas where they are at risk of infection and 280,000 die every year due to this disease (Steinmann et al. 2006; Gryseels et al. 2006; King and Dangerfield-Cha 2008). Typically, disease pathology results from the inflammatory granulomatous reaction triggered in response to parasite egg deposition in the liver and other host tissues (Gryseels et al. 2006).

Despite all the research conducted so far, there are no effective vaccines against parasitic diseases. Treatment is still, therefore, the most efficient method (Date et al. 2007). Praziquantel (PZQ) is, at present, the only drug used for the treatment and control schistosomiasis (Doenhoff et al. 2009). Although it is safe and effective, it is worrying that it is the only drug available to treat a disease that affects millions of people, especially since strains of *Schistosoma* are developing with low sensitivity and/or resistance to PZQ (Abdul-Ghani et al. 2009). Therefore, widespread use of PZQ in endemic zones with the possibility of the emergence of drug-resistant *Schistosoma*, combined with the lack of another effective antischistosomal drug requires that new schistosomicidal compounds be developed (Bertão et al. 2012).

The quinones constitute a broad-ranging and varied family of metabolites that are found in nature. In terms of their molecular structure, quinones can be divided according to the type of aromatic system that sustains the quiononoidic ring: benzoquinones – a benzene ring; naphthoquinones – a naphthalene ring; anthraquinones – a linear or angular anthracene ring. β -lapachone (β -lap, Figure 1) (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b] pyran-5,6-dione), a lipophilic naphthoquinone, analog semi-synthetic of lapachol compound obtained from the bark of trees of the families *Bigoniaceae* and *Verbenaceae* commonly found in many regions of Brazil. Especially in Brazil, its extract has been widely used in folk medicine for centuries to control various diseases (Pinto et al. 1977; Schaffner-Sabba et al. 1984).

Here fig 1

Ortho-naphthoquinone and related compounds were initially investigated in the late 19th and early 20th centuries by the chemist Samuel Hooker. β -Lap has been found as minor constituent during isolation of other naphthoquinones from the heart of ipê trees (Diaz & Medina 1996). On a larger scale it can be produced following the method first developed by Hooker and colleagues through cyclization of lapachol in sulfuric acid by a nucleophilic attack of the oxygen on the isoprenyl side chain and purification by further recrystallizations (Hooker 1892 and 1896). The final product takes the form of acicular, reddish-orange crystals, visible to the naked eye (Hooker 1936; Sun, Geiser and Frydman 1998).

β -lap has been reported to have anti-*Trypanosoma cruzi* (Menna-Barreto et al. 2007; Salas et al. 2008; Ferreira et al. 2011;), antimalarial (Andrade-Neto 2004; Pérez-Sacau et al. 2005), anti-inflammatory (Sitônio et al. 2012), antibacterial (Coelho et al. 2010; Lourenço et al. 2011), antifungal (Medeiros et al. 2010) and antiviral properties (Schuerch and Wehrli 1978; Li et al. 1993). There can be no doubt that its antineoplastic properties have generated the greatest expectations for the molecule. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that β -lap inhibits conventional therapy-resistant tumors, particularly the proliferation of neoplasms of slow cell cycle such as prostate, pancreatic, colon, and some ovarian and breast cancers (Park et al. 2005; Suzuki et al. 2006; Moon et al. 2010).

With regard to the anti-*Schistosoma mansoni* properties of the naphthoquinones, Pinto and colleagues (1997) assessed the topical action of some of their derivatives, including β -lap, on blocking the penetration of cercariae in mice. Other studies involving the control of schistosomiasis using naphthoquinone derivatives include the inhibition of aerobic glycolysis in adult *S. mansoni* worms (Edingl, Tersan and Waite 1947), molluscicidal activity against the adult snail and snail egg masses of *Biomphalaria glabrata* (the intermediate hosts of *S. mansoni*) and activity against cercariae (*S. mansoni* cercariae) (Lima et al, 2002; Camara et al. 2008; Ribeiro et al. 2009).

The present study investigated the antischistosomal properties of β -lap, providing the first *in vitro* study that demonstrates and describes, using scanning electron microscopy, its ability to cause severe membrane damage in adult *S. mansoni* worms. Furthermore, we demonstrate that the β -lap-induced membrane damage effectively killed adult worms.

Materials and methods

Compounds

β-Lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b] pyran-5,6-dione) was synthesized from naturally occurring lapachol derived from *T. avellanae* (Bignoneaceae) using sulfuric acid according to a method developed by Cavalcante and colleagues (2008). Praziquantel was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). All other analytical grade or cell culture reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Brazil).

Ethical considerations, animals and infection

After approval by the Animal Experiments Ethics Committee of the UFPE (23076.020127/2010-47), ten 30-day old male Swiss mice, weighing 28±2g, were percutaneously infected (Olivier and Stirewalt, 1952) with about 120 cercariae of *S. mansoni* (BH strain). This strain was maintained using standard procedures (Boissier and Mone 2001) at the Schistosomiasis Experimental Laboratory of the Keizo Asami Immunopathology Laboratory–LIKA/UFPE and the UFPE's Department of Tropical Medicine. Mice were obtained and kept in the LIKA pound in a controlled environment (temperature between 20±2°C, 12 hour daylight cycle) with free access to food (Labina ® / Purina, São Paulo-SP) and water ad libitum.

In vitro β-Lap and praziquantel treatment of *S. mansoni*

Sixty days after infection the mice were euthanized by cervical sprain and the worms were aseptically recovered by perfusion of the portal system and mesenteric veins with sterile saline (0.9% NaCl w / v) (Smithers and Terry 1965). Male worms were immediately transferred to an RPMI 1640 medium supplemented with 20 mM HEPES, 100 µg/mL penicillin, 100µg/mL streptomycin and 10% fetal bovine serum and rinsed twice with this medium. The worms were distributed (one pair of adult worms per well) in 24-well culture plates with 2 mL of this medium (per well) and the cultures incubated at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂. Two hours after incubation, to allow for adaptation of the worms, β-Lap was added to a final concentration of 50 or 100 µM (from a stock solution of 1 mM in RPMI 1640/1.5% dimethyl

sulfoxide (DMSO)). The control worms were incubated in 1.5% DMSO in an RPMI 1640 medium as a negative control group and in a 10 μ M PZQ as a positive control group. All experiments were performed six times. An inverted microscope was used to evaluate the general conditions of worms including motility, changes in the integument and survival monitored at 3, 6, 18 and 24 hours of culture.

Antischistosomal evaluation criteria

Treatment was considered lethal whenever no worm movement was observed for more than 2 min. Worm motility was scored following β -Lap and PZQ treatment according to the criteria scored in a viability scale of 0–3 proposed by Horiuchi and colleagues (2005). The scoring system was as follows: 3, complete body movement; 1.5, partial body movement or immobile but alive; and 0, dead.

Scanning electron microscopy

For ultrastructural analysis of β -Lap activity against adult *S. mansoni* worms, scanning electron microscopy (SEM) was used. Worms incubated in 50 or 100 μ M β -lap for 3, 6, or 18h were sampled and fixed with 2.5% glutaraldehyde and 4% paraformaldehyde in a 0.1 M sodiumcacodylate buffer (pH 7.2) for 12 h at room temperature (RT). Thereafter, samples were washed in the same buffer and post-fixed with 1% (w/v) OsO₄ in a 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2) for 1 h at RT. Specimens were then dehydrated with increasing concentrations of ethanol and then dried with liquid CO₂ in a critical point dryer machine (Hitachi HCP-2, Hitachi, Japan). Treated specimens were mounted on aluminum microscopy stubs and metalized with gold particles using a FINE-COAT 1100 ion-sputtering apparatus (JEOL, Tokyo, Japan). Specimens were then observed and photographed using an electron microscope (JEOL-25SII, Tokyo, Japan).

Results

β -lap alters motility of adult worms of *S. mansoni*

During all observation intervals (3, 6, 18 and 24h) the drug-free adult *S. mansoni* worms (negative control group) displayed peristaltic movements and characteristic waves throughout the whole body, suckers in constant movement and occasionally adhering to the bottom of the culture plate (score = 3). PZQ, the anti-schistosome drug of choice (positive control group), caused immediate loss of motility in worms leaving them clearly shortened. This effect persisted and became stronger with the passing of time, giving the worm a half-moon shape. After 24 h of exposure 83% of the worms were dead (score = 0) and 17% showed slight movements of the posterior and extremity and oral sucker (score = 1.5). The motility of male *S. mansoni* worms diminished when exposed to β -lap and this depends on the concentration and the incubation time. After 18 hours, 83% of worms exposed to 50 μ M β -lap displayed a reduction in motility with impairment of peristaltic movement and the capacity of their suckers to adhere to the bottom of the culture plates (score = 1.5), and after 24 hours, 67% of the worms were dead (score = 0). When exposed to 100 μ M of β -lap the motility of worms was altered after 6 hours of incubation. At this same concentration, the mortality of worms was observed after 18 hours and all the worms were observed to have been killed after 24 hours (Table 1).

Here table 1

Ultrastructural analysis of β -lap-induced surface damage in *S. mansoni*

Adult *S. mansoni* worms incubated for 18 h in a supplemented RPMI 1640 medium and 1.5% DMSO showed intact surface structure and topography (Fig. 2 a-c). The surface of male schistosomes displayed the gynecophoral canal (Fig. 2a), a longitudinal fold on the middle and posterior body that houses the female for the purpose of mating and reproduction. The anterior portion is characterized by an oral and a ventral sucker, smooth and cylindrical tegument with numerous ciliated papillae (Fig. 2b). At a higher magnification of the mid-dorsal region of the worms a large number of tubercles with typical spines were observed; moreover, ciliated

papillae, dome-shaped papillae and tegumental parallel-arranged folds were also observed (Fig. 2c).

The 50 and 100 μ M dose responses to β -lap in adult schistosomes at 3, 6 and 18 h are given in Fig. 3 (a-i) and Fig. 4 (a-i) respectively. β -lap had a clear effect on the musculature of the worms, with dorsoventral curving at a concentration of 50 μ M (Fig. 3 - a, d, and g). This effect was more accentuated at a concentration of 100 μ M, at which the worms were observed to shrink, in time-dependent fashion, taking the form of a corkscrew at 18 h (Figs. 4 - a, d and g).

After 3 h of incubation with 50 μ M of β -lap bubbles were observed and a focal lesion in the tegument into the anterior region of the worms (Fig. 3b) and small bubbles appeared in the surface tegument of the worm forming focal lesions as a mass (Fig. 3c). By 6 h after incubation focal lesions in various parts of the body became more evident. Lesions were observed around the oral sucker (Fig. 3e) and the lateral dorsal portion of the tegument with reduced and eroded tubercle spines (Fig. 3f). By 18 h after incubation there was generalized swelling on the anterior portion and extensive areas of cracking and bubbles (Fig. 3 h). Severe alterations in the tegument characterized by swelling, dislocation and erosion of tubercles, the loss of spicules and widening of the parallel-arranged folds were also observed (Fig. 3 i).

The most significant tegumental changes in the anterior portion of the worms, when incubated with 100 μ M of β -lap, were intensive evolution of edema and curvature giving rise to a wrinkled surface with obvious furrows developing a fibrous appearance over time (Fig. 4 b, e and h). By 3 h after incubation, the tegument had broken tubercles and loss of spicules (Fig. 4 c). After 6 h, there were various blisters, some burst and an eroded section of the tegument with exposure of subtegumental tissue. At 18 h, blistering was observed along with obvious protuberance of the anterior dorsal tegument with the emergence of coalesced folds (Fig 4 h and i).

Here Figs 2, 3 and 4

After 3 h of incubation with 10 μ M PZQ (an antischistosomal drug), an obvious contraction of longitudinal muscles occurred; the worms were curved and shortened in appearance (Fig. 5 a). The effect of PZQ after 6 h of incubation was marked by the presence of

tubercles alongside loss of spicules, blistering over the surface of the tegument and the beginning of the appearance of holes in the tegument (Fig 5 b and c)

Here fig 5

Discussion

Worldwide, one in thirty individuals has schistosomiasis (Chitsulo, Loverde and Engels 2004). Extreme poverty, ignorance of the risks, inadequate or total lack of public health facilities plus the unsanitary conditions in which millions of people lead their daily lives are all factors contributing to the risk of infection (Fenwick et al. 2003). This led King and colleagues (2005) to describe schistosomiasis as a pandemic and to blame it for 2-15% of the underdevelopment of affected individuals (King et al. 2005).

Praziquantel (PZQ) has been on the market for over 40 years and is, at present, the only drug of choice for treatment of schistosomiasis (Doenhoff et al. 2009). Despite being safe and effective against all species of *Schistosoma*, its intensive use in endemic areas has led to the emergence of resistant strains. This has raised concern in the medical community and prompted The Special Program for Research and Training in Tropical Disease to encourage the discovery and development of new antischistosomal compounds. As a result, various studies have investigated promising new compounds both *in vivo* and *in vitro* (Abdul-Ghani et al. 2009).

β-Lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione; β -lap) is a naturally-occurring quinone derived from, found in *Tabebuia avellanedae* (whose popular Portuguese name is: Ipê roxo), a plant of the *Bignoneaceae* family commonly found in many regions of Brazil. The most important feature of this drug is its *in vitro* and *in vivo* antitumor properties against different cell lines (Park et al. 2005; Suzuki et al. 2006; Moon et al. 2010). In the clinic, some antitumor drugs (dactinomycin, doxorubicin, bleomycin and mitomycin C) show the quinone group and this corroborates the importance of this chemical group for the development of new anti-cancer drugs (Gewirtz 1999; Galm et al. 2005; Zhang 2006; Dong et al. 2009).

In *in vitro* assays, which are routinely used for the triage of new compounds with schistosomicidal potential, the tegument of the worm is an important target for observation since it comes into direct contact with the compounds. The tegument of *S. mansoni* is a barrier that

isolates it from the external environment and ensures maintenance of vital functions. It is responsible for absorbing nutrients, metabolizing lipids and cholesterol, the proliferation and repair of tissue, and the selective absorption of drugs. These characteristics reinforce the importance of studies of the tegument of *S. mansoni*, since this structure is an important target for the action of schistosomicidal drugs (Krautz_Peterson et al. 2007; Faghiri and Skelly 2009; Pereira et al. 2011). We therefore hypothesized that β -lap may exhibit schistosomicidal properties by interfering with the stability of the membrane and the structural integrity of the tegument. To test this hypothesis, we first established the concentration of β -lap capable of causing the death of adult worms after 24h exposure *in vitro*. For this triage we used the MTT cytotoxicity test (Mosmann 1983). Based on exposure time and the MTT test, the concentrations of 50 μ M and 100 μ M were used to study the capacity of β -lap to alter motility and cause lesions in the tegument of adult worms.

The present study used the BH strain, native to Minas Gerais, Brazil. This strain predominates in endemic regions in Brazil, which are home to around 25 million people at constant risk of infection and around six million infected individuals across Brazil, which is the country on the American continent with the largest number of infections (Lambertucci 2010). We evaluated the ultra-structural alterations in adult male worms, since the sexually mature females do not come into direct contact with the micro-environment of the host and alterations in the tegument are more pronounced in males (Nahed, Riad and Yomna 2009; Mostafa and Soliman 2002; Manneck, Haggemuller and Keiser 2010).

This is the first report of an anthelmintic effect of β -lap on adult *S. mansoni*. In the present study, surface membrane damage and the number of dead parasites were both dose- and time-dependent. Table 1 and Figures 3 and 4 illustrate the severe damage to the surface of adult male schistosomes induced by β -lap treatment. The motility test, as similarly indicated by means of MTT cytotoxic test, revealed an increase in the number of dead parasites that was concentration- and time-dependent following β -lap treatment.

Alterations in motility began after 6 hours of incubation at concentrations of 50 μ M and 100 μ M of β -lap (Table 1). However, total mortality of worms occurred 24 hours after treatment at a concentration of 100 μ M of β -lap. During this same time interval, 67% of the worms died at a concentration of 50 μ M. β -lap caused paralysis and strong dorsoventral curvature in addition to progressive surface membrane damage characterized by peeling, spine reduction and erosion,

blister formation and rupture, the emergence of holes and lesions of a fibrous appearance, but the worms were not shortened like those exposed to PZQ. The tegumental changes observed in the present study are similar to those demonstrated in adult *S. mekongi* treated with artesunate (Jiraungkoorskul et al. 2005), in *S. haematobium* treated with combined atorvastatin and medroxyprogesterone acetate (Soliman & Ibrahim 2005) and in *S. mansoni* treated with artemether (Xiao et al. 1995) and PZQ (Xiao et al. 1995; Xiao et al. 2000; Lorsuwanarat et al. 2013).

Despite extensive studies, the exact action mechanism of PZQ is still not fully understood. However, it is known that PZQ first causes rapid inflow of calcium, which leads to spasmodic contraction of worm musculature. Secondly, the tegument of the worm undergoes major destruction, eventually resulting in the death of the parasites (Doenhoff et al., 2008 and 2009). In the case of β -lap exposure, the progressive surface membrane damage does not appear to be directly related to the inflow of calcium, since β -lap inhibits the inflow of Ca^{2+} and causes efflux of these ions, suggesting that the increase in plasma Ca^{2+} is responsible for the apoptosis brought on by β -lap (Tagliarino et al. 2001; Bente et al. 2006).

Recently, 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone, known as plumbagin has proved to be active against adult *S. mansoni* worms, altering motility, mortality and the tegument. The effects of plumbagin on *S. mansoni* was dose- and time-dependent and the surface of the male parasites appeared to be more greatly damaged by the drugs than that of females (Lorsuwanarat et al. 2013). The alterations in the tegument brought about by plumbagin include edema, cracking, a wrinkled surface and furrows that become fibrous over time. These alterations are similar to those observed in our study using β -lap (Fig. 3 h and fig 4 e and h).

Naphthoquinones, including β -lap, have been shown to be active against other phases in the development of *S. mansoni*. Pinto and colleagues (1997) evaluated naphthoquinone derivatives that might topically inhibit the penetration of *S. mansoni* cercariae. In this experiment, of the 23 derivatives evaluated, 15 blocked penetration by cercariae when applied to the tails of mice 24 hours prior to infection through the tail. Also in this experiment, the group of animals exposed to β -lap resulted in 100% blockage, meaning that no single worm was recovered. The authors conclude that bioactive derivatives of naphthoquinones may be used as prophylactic drugs in endemic regions (Pinto et al. 1997). Various studies have pointed out the importance of topical formulations that are able to block the penetration of cercariae (Pinto et al.

1997; Wulff, Haeberlein and Hass 2007; Hass and Haeberlein 2009; Kasny et al. 2007), since *S. mansoni* infection depends on penetration and adequate adaptation within the first 4-5 days in strata of the definitive host's skin (Brachs and Haas 2008, Haeberlein and Hass 2008).

Furthermore, naphthoquinone derivatives are also active against *S. mansoni*'s intermediate host. These compounds kills adult snails and the spawn of *B. glabrata* (Dos Santos et al. 2000; Lima et al, 2002a; Lima et al, 2002b; Camara et al. 2008; Ribeiro et al. 2009)

β -lap, like other naphthoquinones, after undergoing enzymatic reduction *in situ* (redox cycle) may produce species that react to oxygen (EROS) ($O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, 1O_2 and H_2O_2) (Solange et al. 2011). β -lap thus speeds up intracellular hypoxia in tumor cells and in the cells of micro-organisms by the production of super-anions, increasing lipid peroxidation, protein disorganization (Melissa et al. 2007; Pinto and Castro 2009; Bey 2007; Salas et al. 2008) and rendering enzymatic topoisomerases I (Boothman, Trask and Pardee 1989) and II (Krishnan and Bastow 2000) inactive. However, the mechanism by which schistosomicidal activity occurs is still not understood.

In vitro β -lap causes the formation of hydrogen peroxide, mitochondrial disruption and DNA fragmentation as well as ultrastructural alterations to the epimastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Menna-Barreto 2007; Salas et al. 2008). β -lap exhibits antimalarial properties *in vitro* e *in vivo* against strains that are both sensitive and resistant to chloroquine (Andrade-Neto 2004; Pérez-Sacau et al. 2005). The antifungal properties of β -lap against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed mice was investigated by Medeiros and colleagues (2010). In this study, the fungal load was reduced up to 104 times in the lungs, brain, spleen and liver. Furthermore, β -lap has been shown to have satisfactory activity against both gram positive and gram negative bacteria (Kenneth et al. 2012) and to inhibit the replication of the HIV-1 virus, of the reverse transcriptase of the avian myeloblastosis virus, of Rauscher's murine leukemia and of the α -polimerase of DNA (Schuerch & Wehrli 1978; Li et al. 1993).

New drugs with potential anti- *S. mansoni* properties are being identified every day and often serve as models for possible molecular alterations that result in more effective and less toxic compounds. The present study is the first to present *S. mansoni* as a new target for β -lap. We have demonstrated the susceptibility of adult *S. mansoni* worms of the BH strain, but detailed investigation will be required to understand the molecular mechanisms underlying the

antischistosomal activity of β -lap and to establish this drug as part of the available arsenal of schistosomicidal compounds.

Acknowledgments This work received financial support for Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq - Brasil, Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (FACEPE) and Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

References

- Abdul-Ghani RA, Loutfy N, Hassan A (2009) Experimentally promising antischistosomal drugs: a review of some drug candidates not reaching the clinical use. *Parasitol Res* 105:899-906
- Andrade-Neto VF, Goulart MOF, Silva-Filho JF, Silva MJ, Pinto MCFR, Pinto AV, Zalis MG, Carvalho LH, Krettli AU (2004) Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg Med Chem Lett* 14:1145–1149
- Bentle MS, Reinicke KE, Bey EA, Spitz DR, Boothman DA (2006) Calcium-dependent modulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair. *J Biol Chem* 281:33684-33696
- Bertão HG, Silva RAR, Padilha RJR, Albuquerque MCPA, Gandhi Rádis-Baptista (2012) Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Parasitol Res* 110:2465-2473
- Bey EA, Bentle MS, Reinicke KE, Dong Y, Yang CR, Girard L, Minna JD, Bornmann WG, Gao J, Boothman DA (2007) An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by beta-lapachone. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:11832-11837
- Boissier J, Mone H (2001) Male-female larval interactions in *Schistosoma mansoni* infected *Biomphalaria glabrata*. *Int J Parasitol* 31:352–358
- Boothman DA, Trask DK, Pardee AB (1989) Inhibition of Potentially Lethal DNA Damage Repair in Human Tumor Cells by β -Lapachone, an Activator of Topoisomerase I. *Cancer Res* 49:605-612
- Brachs S, Haas W (2008) Swimming behaviour of *Schistosoma mansoni* cercariae: responses to irradiance changes and skin attractants. *Parasitol Res* 102:685–690
- Camara CA, Silva TMS, Silva TG, Martins RM, Barbosa TP, Pinto AC, Vargas MD (2008) Molluscicidal activity of 2-hydroxy-[1,4]naphthoquinone and derivatives. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 80:329-334
- Cavalcante FA, Silva JLV, Carvalho VMN, Camara CA, Silva TM, Pinto AC, et al. (2008) Spasmolytic activity of lapachol and its derivatives, alpha and beta-lapachone, on the guinea-pig ileum involves blockade of voltage-gated calcium channels. *Rev Bras Farmacog* 18:183–189
- Chitsulo L, Loverde P, Engels D (2004) Schistosomiasis. *Nat Rev Microbiol* 2: 12–13.

- Coelho TS, Silva RS, Pinto AV, Pinto MC, Scaini CJ, Moura KC, Almeida da Silva P (2010) Activity of β -lapachone derivatives against rifampicin-susceptible and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)* 90:293-297
- Date AA, Joshi MD, Patravale VB (2007) Parasitic diseases: liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews* 59:505-521
- Diaz F, Medina JD (1996) Furanonaphthoquinones from *Tabebuia ochracea* spp. *J Nat Prod* 59:423-424
- Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J (2008) Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis* 21:659-667
- Doenhoff MJ, Hagan P, Cioli D, Southgate V, Pica-Mattoccia L, Botros S, Coles G, Tchuem Tchuenté LA, Mbaye A, Engels D (2009) Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology* 136:1825-1835
- Dong Y, Chin SF, Blanco E, Bey EA, Kabbani W, Xie XJ, Bornmann WG, Boothman DA, Gao J (2009) Intratumoral delivery of beta-lapachone via polymer implants for prostate cancer therapy. *Clin Cancer Res* 15:131-139
- Dos Santos AF, Ferraz PAL, Pinto AV, Pinto MCRF, Goulart MOF, Sant'Ana AEG (2000) Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. *Int J Parasitol* 30:1199-1202
- Edingl E, Tersan A, Waite JF (1947) Effect of 2-Methyl-1,4-Naphthoquinone on Glycolysis of *Schistosoma mansoni*. *Proc Soc Exp Biol Med* 64:111-113
- Faghiri Z, Skelly PJ (2009) The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake *FASEB J* 23:2780-2789
- Fenwick A et al (2003). Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends parasitol* 19:509-15
- Ferreira SB, Salomão K, Silva FC, Pinto AV, Kaiser CR, Pinto AC, Ferreira VF, Castro SI (2011) Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone analogues. *Eur J Med Chem* 46:3071-3077
- Galm U, Hager MH, Van Lanen SG, Ju H, Thorson JS, Shen B (2005) Antitumor Antibiotics: Bleomycin, Eneidiynes, and Mitomycin. *Chem Rev* 105:739-758
- Gewirtz DA (1999) A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol* 57:727-741
- Gryseels B, Polman K, Clerinx J, Kestens L (2006) Human schistosomiasis. *Lancet* 368:1106-1118
- Haas W, Haerberlein S (2009) Penetration of cercariae into the living human skin: *Schistosoma mansoni* vs. *Trichobilharzia szidati*. *Parasitol Res* 105:1061-1066
- Haerberlein S, Haas W (2008) Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitol Res* 102:657-662
- Hooker SC (1892) The Constitution of ``Lapachic Acid`` (Lapachol) and Derivatives. *J Chem Soc* 61:611-650
- Hooker SC (1896) The Constitution of lapachol and its derivatives. The Structure of the Amylene Chain. *J. Chem. Soc.* 69:1355
- Hooker SC (1936) The constitution of lapachol and its derivatives. The structure of Paterno's isolapachol. *J Am Chem Soc* 59:1190-1195

- Horiuchi A, Satou T, Akao N, Koike K, Fujita K, Nikaido T (2005) The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. *Vet Parasitol* 129:83–87
- Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Sobhon P, Riengrojpitak S, Kangwanrangsang N (2005) Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice. *Parasitol Int* 54:177–183
- Kasny M, Mikes L, Dalton JP, Mountford AP, Horak P (2007) Comparison of cysteine peptidase activities in *Trichobilharzia regenti* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 134:1599–1609
- Kenneth OE, Senthil PK, Victor K, Gabriel NF, Henrietta L, Marion JJM, Namrita L, Sundarababu B (2012) Cobalt mediated ring contraction reaction of lapachol and initial antibacterial evaluation of naphthoquinones derived from lapachol. *Med Chem Res* 21:2117–2122
- King CH, Dangerfield-Cha M (2008) The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic Illn* 4:65–79
- King CH, Dickman K, Tisch DJ (2005) Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet*, 365:1561–1569
- Krautz-Peterson G, Camargo S, Huggel K, Verrey F, Shoemaker CB, Skelly PJ (2007) Amino acid transport in Schistosomes: Characterization of the permease heavy chain SPRM1hc. *The Journal of Biological Chemistry* 282:21767–21775
- Krishnan P, Bastow KB (2000) Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by Pyranonaphthoquinone derivatives – Eleutherin, α lapachone and β lapachone. *Biochemical Pharmacology* 60:1367–1379
- Lambertucci JR (2010) Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 105:422–435
- Li CJ, Zhang LJ, Dezube BJ, Crumpacker CS, Pardee AB (1993) Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Medical Sci* 90:1839–1842
- Lima NMF, Correia CS, Ferraz PAL, Pinto AV, Pinto MCRF, Sant’Ana AEG, Goulart MOF (2002b) Molluscicidal hydroxynaphthoquinones and derivatives. Correlation between their redox potentials and activity against *Biomphalaria glabrata*. *J Braz Chem Soc* 13:822–829
- Lima NMF, Santos AF, Porfírio Z, Goulart MOF, Santana AEG (2002a) Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotic*. *Acta Tropica* 83:43–47
- Lorsuwanarat N, Saowakon N, Ramasoota P, Wanichanon C, Sobhon P (2013) The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. *Experimental Parasitology* 133:18–27
- Lourenço AL, Abreu PA, Leal B, da Silva Júnior EN, Pinto AV, Pinto Mdo C, Souza AM, Novais JS, Paiva MB, Cabral LM, Rodrigues CR, Ferreira VF, Castro HC (2011) Identification of nor- β -lapachone derivatives as potential antibacterial compounds against *Enterococcus faecalis* clinical strain. *Curr Microbiol* 62:684–689
- Manneck T, Haggenmüller Y, Keiser J (2010) Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni* *Parasitology* 137:85–98

- Medeiros CS, Pontes-Filho NT, Camara CA, Lima-Filho JV, Oliveira PC, Lemos AS, Leal AFG, Brandão JOC, Neves RP (2010) Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. *Braz J Med Biol Res* 43:345-349
- Melissa SB, Kathryn ER, Ying D, Erik AB, David AB (2007) Nonhomologous End Joining Is Essential for Cellular Resistance to the Novel Antitumor Agent, B-Lapachone. *Cancer Res* 67:6936- 6945
- Menna-Barreto RFS, Corrêa JR, Pinto AV, Soares MJ, Castro SL (2007) Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. *Parasitol Res* 101:895–905
- Moon DO, Kang CH, Kim MO, Jeon YJ, Lee JD, Choi YH, Kim GY (2010) β -Lapachone (LAPA) decreases cell viability and telomerase activity in leukemia cells: suppression of telomerase activity by LAPA. *J Med Food* 13:481–488
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63
- Mostafa OM, Soliman MI (2002) Experimental use of black-seed oil against *Schistosoma mansoni* in albino mice: II. Surface topography of adult worms. *Egypt J Med Lab Sci* 11:79-85
- Nahed HA, Riad HAT, Yomna IM (2009) Effects of garlic on albino mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*: A parasitological and ultrastructural study *Trop Biomed* 26:40-50
- Olivier L, Stirewalt MA (1952) An efficient method for exposure of mice to cercariae of *S.mansoni*. *Journal of Parasitology* 38:19–23
- Park HJ, Ahn KJ, Ahn SD, Choi E, Lee SW, et al (2005) Susceptibility of cancer cells to β -lapachone is enhanced by ionizing radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 61:212–219
- Pereira AS, Padilha RJ, Lima-Filho JL, Chaves ME (2011) Scanning electron microscopy of the human low-density lipoprotein interaction with the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res* 109:1395–1402
- Pérez-sacau E, Estévez-braun A, Ravelo AG, Gutiérrez YD, Giménez TA (2005) Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and beta-lapachone. *Chem Biodivers* 2:264-74
- Pinto AV, Castro SL (2009) The Trypanocidal Activity of Naphthoquinones: A Review. *Molecules* 14:4570-4590
- Pinto AV, Pinto MCR, Gilbert B, Pellegrino J, Mello RT (1997) *Schistosoma mansoni* blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: I. Naphthoquinones and derivatives. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 71:133–135
- Ribeiro KAL, Carvalho CM, Molina MT, Lima EP, Lópezmontero E, Reys JRM, Oliveira MBF, PintoAV, Sant'ana AEG, Goulart MOF (2009) Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica* 111:44-50
- Salas C, Tapia RA, Ciudad K, Armstrong V, Orellana M, Kemmerling U, Ferreira J, Maya JD, Morello A (2008) *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg Med Chem* 16:668-674

- Schaffner-Sabba K, Schmidt-Ruppin KH, Wehrli W, Schuerch AR, Wasley JW (1984) beta-Lapachone: synthesis of derivatives and activities in tumor models. *J Med Chem* 27:990-994
- Schuerch AR, Wehrli W (1978) β -Lapachone, an Inhibitor of Oncornavirus Reverse Transcriptase and Eukaryotic DNA Polymerase- α . *Eur J Biochem* 84:197-205
- Sitônio MM, Júnior CHRC, Campos IA, Silva JBNF, Lima MCA, Góes AJS, Maia MBS, Rolim PJN, Silva TG (2012) Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione (b-lapachone). *Inflamm Res*. doi: 10.1007/s00011-012-0557-0
- Smithers SR, Terry RJ (1965) The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 55:695–700
- Solange LC, Denise GJ, Batista MM, Batista WB, Anissa D, Elen MS, Rubem FSMB, Gabriel MO, Kelly S, Cristiane FS, Patricia BS, Maria NCS (2011) Experimental Chemotherapy for Chagas Disease: A Morphological, Biochemical, and Proteomic Overview of Potential *Trypanosoma cruzi* Targets of Amidines Derivatives and Naphthoquinones. *Mol Bio Int*. doi:10.4061/2011/306928
- Soliman MF, Ibrahim MM (2005) Antischistosomal action of atorvastatin alone and concurrently with medroxyprogesterone acetate on *Schistosoma haematobium* harboured in hamster: surface ultrastructure and parasitological study. *Acta Trop* 93:1–9
- Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J (2006) Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet Infectious Diseases* 6:411-425
- Sun JS, Geiser AH, Frydman AH (1998) A preparative synthesis of lapachol and related naphthoquinones. *Tetrahedron Lett* 39:8221-8224
- Suzuki M, Amano M, Choi J, et al. (2006) Synergistic effects of radiation and beta-lapachone in DU-145 human prostate cancer cells *in vitro*. *Radiat Res* 165:525-531
- Tagliarino C, Pink JJ, Dubyak GR, Nieminen AL, Boothman DA (2001) Calcium is a key molecule in β -lapachone-mediated cell death. *J Bio Chem* 276:19150-19159
- Wulff C, Haerberlein S, Haas W (2007) Cream formulations protecting against cercarial dermatitis by *Trichobilharzia*. *Parasitol Res* 101:91–97
- Xiao SH, You JQ, Yang YQ, Wang CZ (1995) Experimental studies on early treatment of schistosomal infection with artemether. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 26:306–318
- Xiao S, Shen B, Chollet J, Utzinger J, Tanner M (2000) Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harbored in mice treated with artemether. *J Parasitol* 86:1125–1132
- Zhang G, Fang L, Zhu L, Zhong Y, Wang PG, Sun D (2006) Syntheses and biological activities of 3'-azido disaccharide analogues of daunorubicin against drug-resistant leukemia. *J Med Chem* 49:1792-1799

CAPTIONS

Table 1 Motility scores for control, and worms treated with praziquantel (PZQ) and β -lapachone (β -lap) at different hours post-incubation.

Groups	Percent of worms (%) in motility scores after incubation											
	3 h			6 h			18 h			24 h		
	3	1.5	0	3	1.5	0	3	1.5	0	3	1.5	0
Control	100			100			100			100		
PZQ		100			100			25	75		17	83
β -lap												
50 μ M	100			75	25		17	83			33	67
100 μ M	100			42	58			75	25			100

3, movement of whole body; 1.5, movement of only one part of body or immobile but not dead; 0, dead.

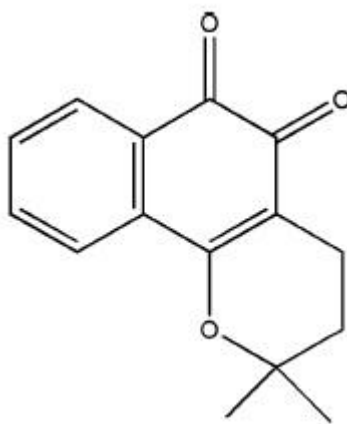


Fig. 1 Chemical structures of β -lapachone

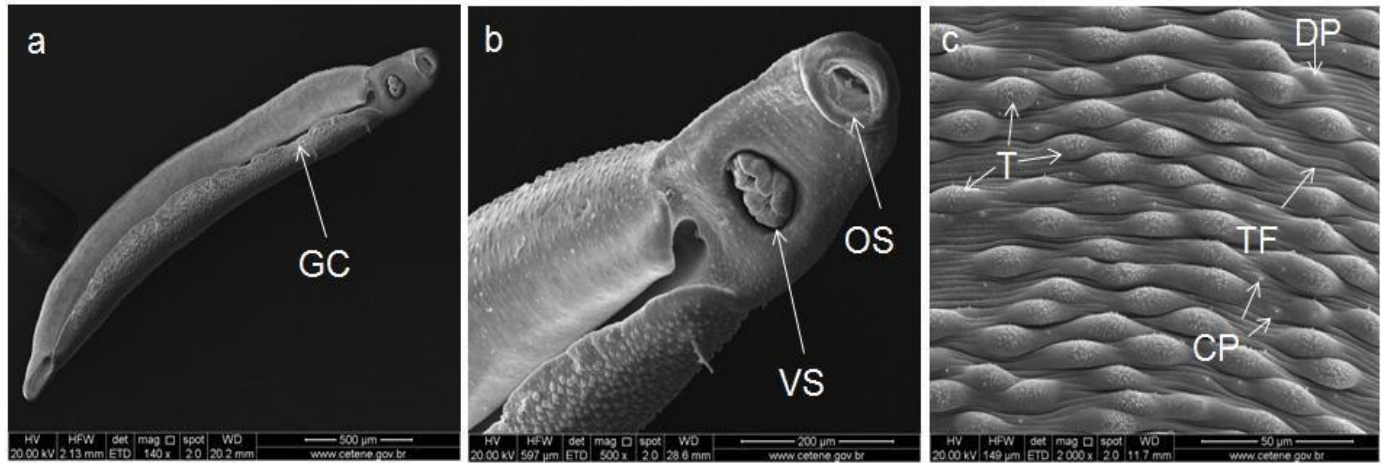


Fig. 2 a-c Scanning electron microscopy (SEM) of the tegument of the adult male *S. mansoni* worms from the negative control group. Parasites incubated in maintenance medium for 18 h; (a, $\times 140$) showing gynecophoral channel (GC); (b, $\times 500$) anterior portions showing oral sucker or acetabulum (OS) and ventral sucker (VS); (c, $\times 2,000$) Dorsal region where tubercles (T), ciliated papillae (CP), dome-shaped papillae (DP) and tegumental parallel-arranged folds (TF) are visible.

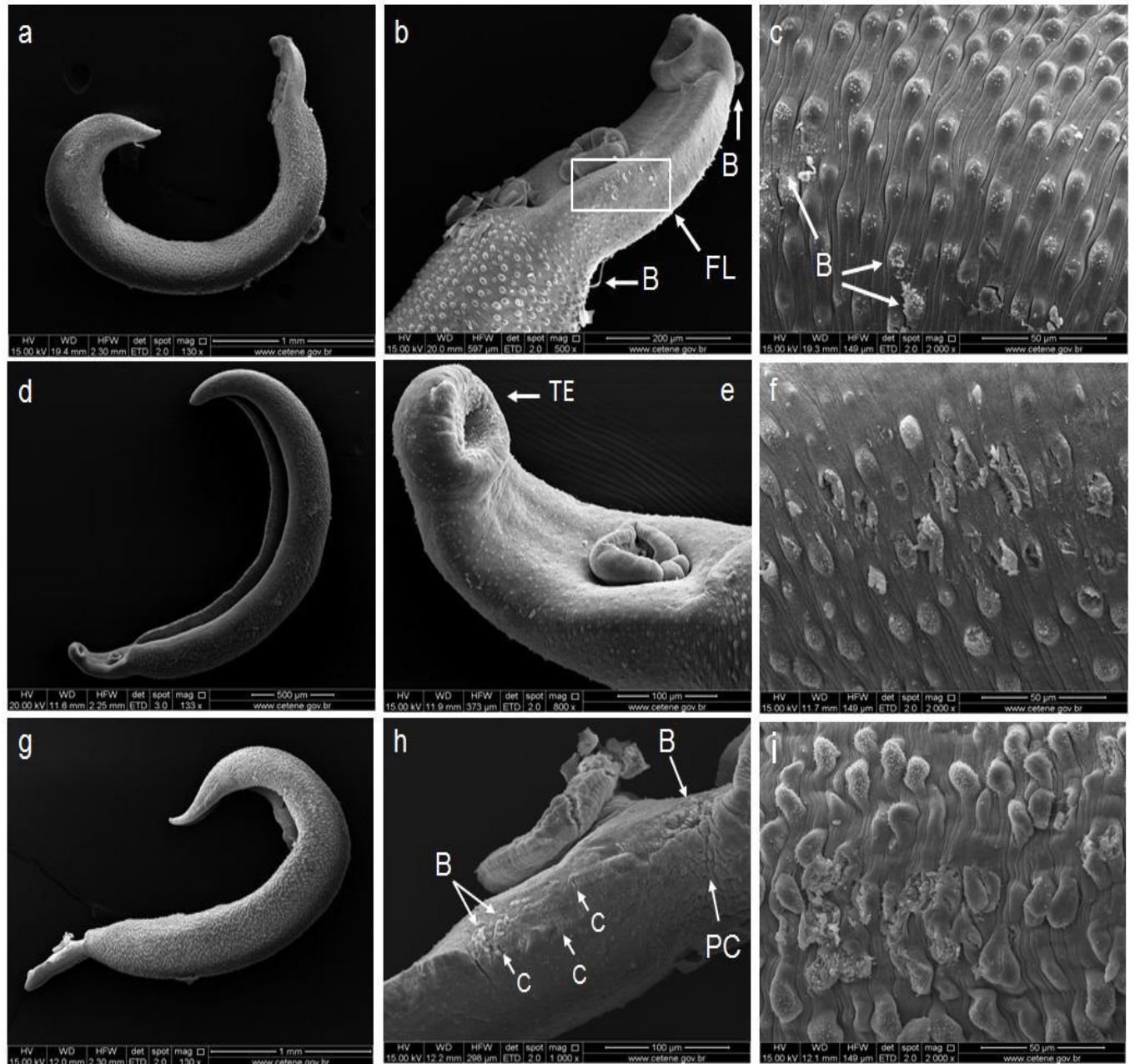


Fig. 3 a-i SEM images of adult male *S. mansoni* worms exposed to 50 μ M of β -lap. At 3 h (a, x130) showing dorsoventral curvature; (b, x500) enlarged view of a showing the anterior region with blobs and focal lesion on the tegument; (c, x2,000) dorsal surface showing a few small blobs as a mass (B); at 6 h (d, x133) worms dorsoventrally curved as in a; (e, x800) enlarged view of anterior portion of d showing erosion of tegument (TE) around the oral sucker; (f, x2,000) lesions of the dorsal lateral tegument showing erosion of tubercles; at 18 h (g, x130) showing worm with more dorsoventral curvature than in a and d; (h, x1,000) the anterior part of the tegument swollen, deep coalesced folds (PC) and areas of cracking (C) and blistering (B); (i, x2,000) tegument tubercles eroded and loss of spicules.

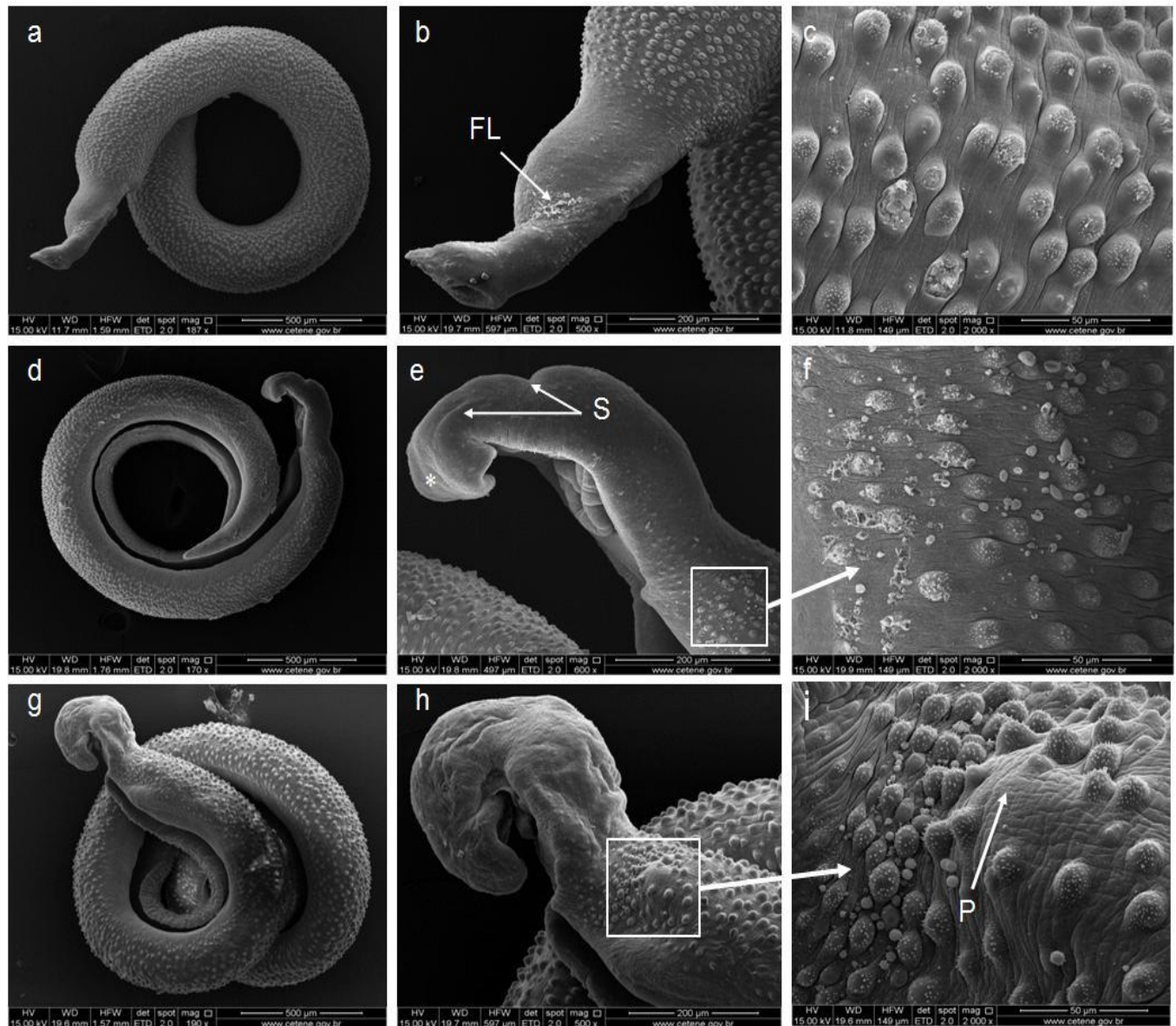


Fig. 4 a-i SEM images of adult male *S. mansoni* worms exposed to 100 μ M of β -lap. (a, x187) (d, x170) (g, x190) the worms roll up to form, in g, a corkscrew shape. At 3 h (a, x187) the worm rolled up dorsoventrally; (b, x500) enlarged view of anterior portion of a showing swollen tegument and focal lesion (FL); (c, x2,000) damaged tubercles with loss of spicules and exposure of subtegumental tissue; at 6 h (d, x170) worm showing more intensive contraction than in a; (e, x600) enlarged view of d showing contracted anterior portion (*), swollen tegument, presence of furrows (S) and damage to the lateral dorsal part of the tegument; (f, x 2000) enlarged view of e showing subtegumental layer and presence of blistering; at 18 h (g, x190) worm severely curved dorsoventrally; (h, x500) enlarged view of anterior portion of g severely contracted with swollen tegument showing deep furrows; (i, x2,000) enlarged view of h showing lateral dorsal tegument with presence of various blisters (B) and area with clear protuberance (P).

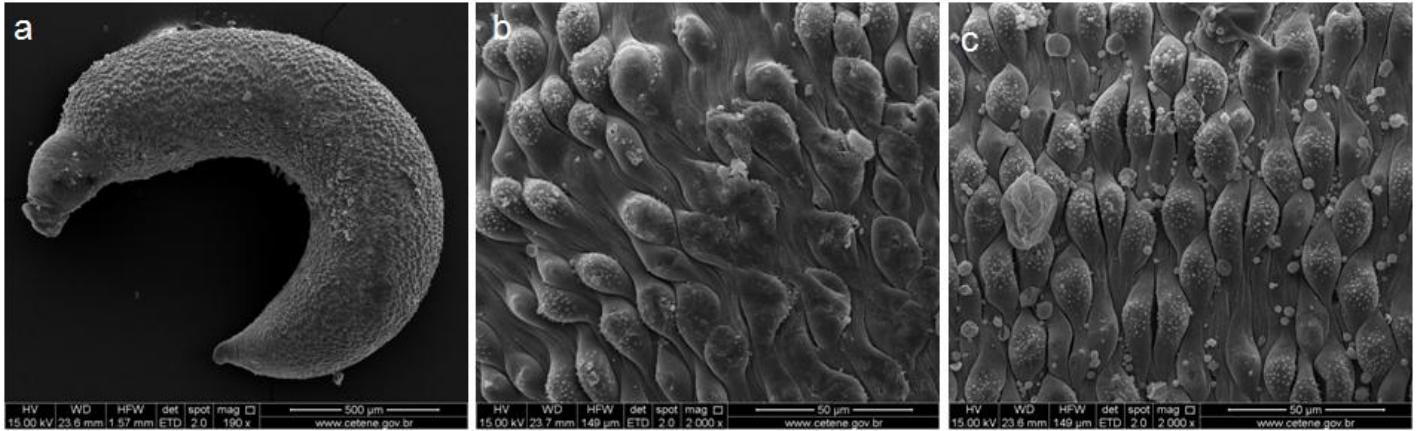


Fig. 5 a-c SEM images of adult male *S. mansoni* worms exposed to 10 μ M of PZQ. At 3 h (a, x190) showing worm severely contracted and shortened; at 6 h (b, x 2,000) tubercles with loss of spicules and emergence of holes in tegument; (c, x2,000) blisters over surface of tegument juxtaposed with tubercles.

Parasitology
Research



[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)



[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Monica Albuquerque

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to *Parasitology Research*.

Manuscript ID: PR-2012-1320

Title: Ultrastructural analysis of β -Lapachone-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms

Authors: Aires, André
Ximenes, Eulália
Silva, Renata
Barbosa, Vanessa
Góes, Alexandre José
Peixoto, Christina
Souza, Valdenia Maria
Albuquerque, Monica

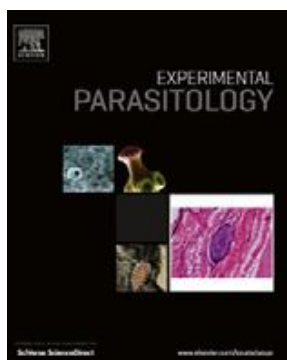
Date Submitted: 21-Dec-2012

Print Return to Dashboard

ScholarOne Manuscripts™ v4.10.0 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2012. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

Follow ScholarOne on Twitter

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)



β-Lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b] pyran-5,6-dione) contra diferentes estágio do Schistosoma mansoni em camundongos

André de Lima Aires^{a,b}

Eulália Camelo Pessoa Azevedo Ximenes^c,

Vanessa Xavier Barbosa^c,

Alexandre José da Silva Góes^c,

Valdênia Maria Oliveira Souza^a,

Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque^{a,b*}

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

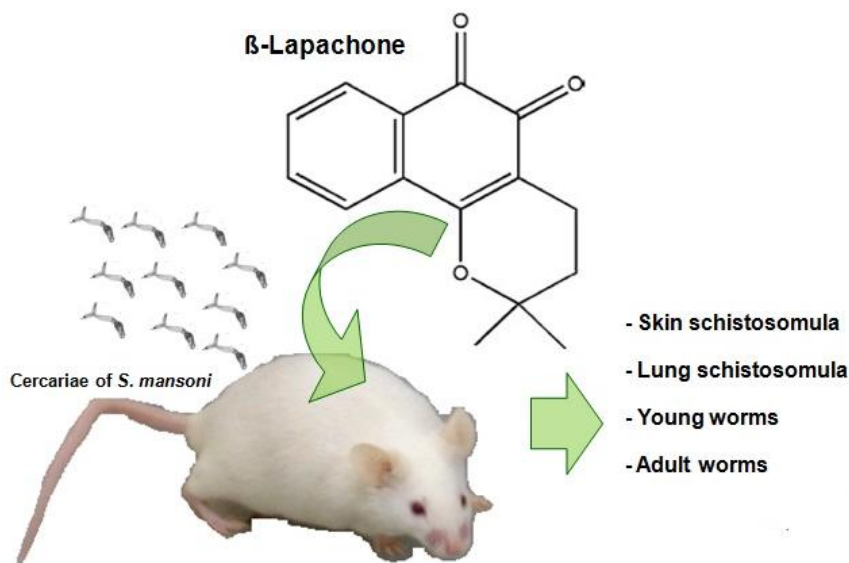
^bCentro de Ciências da Saúde - Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^cCentro de Ciências Biológicas - Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Highlights

- β-lap tem atividade contra diferentes estágio do *S. mansoni*.
- β-lap reduz a carga de vermes totais e de fêmeas.
- β-lap reduz o número de ovos e granulomas no tecido hepático.
- β-lap reduz o tamanho de granuloma hepático e modifica o padrão de oviposição.
- Produção de ROS e subsequente ação sobre mitocôndrias pode ser o principal alvo de β-lap.

Graphical abstract



Palavras-chaves : β-lapachona, modelo murino, estágios evolutivos do *S. mansoni*

Resumo

A atividade da β -lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona, β -lap) contra diferentes estágios de *Schistosoma mansoni* foi investigada em camundongos infectados com 50 cercárias (cepa BH). Os camundongos foram tratados por via intraperitoneal na dose de 50 mg/kg durante 5 dias consecutivos, começando no dia 1°, 14°, 28° e 45° após a infecção, para avaliar o efeito de β -lap sobre esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens (antes da oviposição) e vermes adultos (após oviposição), respectivamente. Todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical 60 dias após a infecção. β -lap reduziu significativamente ($p < 0,001$) a carga parasitária total em 29,78%, 37,2%, 24,2% e 40,22%, quando administrado nas fases de esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens e vermes adultos, respectivamente. Redução significativa também foi alcançada na carga de vermes fêmeas para os mesmos esquemas terapêuticos. Em todos os grupos, houve redução significativa no número de ovos e granulomas no tecido hepático. Quando a intervenção foi realizada durante a fase de vermes adultos, β -lap reduziu o tamanho dos granulomas hepático além de reduzir o percentual de ovos imaturos e aumentar a porcentagem de ovos maduros e mortos. Nossos dados indicam que β -lap tem propriedades esquistossomicidas moderadas. Adicionalmente, sua molécula pode ser usada como protótipo para a síntese de novos derivados de naftoquinonas com potencial esquistossomicida. Além disso, futuros estudos com diferentes formulações contendo β -lap poderam ajudar a elucidar a melhor dose e via de administração e seu mecanismo de ação contra *Schistosomas*.

Introdução

A esquistossomose é uma doença crônica e debilitante causada por vermes do gênero *Schistosoma*. A infecção é potencialmente fatal com manifestações patológicas severas no sistema hepato-esplênico e no trato gastrointestinal (Neghina et al., 2009). Ela está incluída na lista de doenças negligenciadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e apresenta um significativo impacto econômico e social. Estima-se que 779 milhões de pessoas estão em risco constante de infecção, 207 milhões estão infectadas, das quais 120 milhões são sintomáticos, 20

milhões desenvolveram a forma crônica e mais de 500.000 morrem a cada ano (Steinmann et al. 2006; Organização Mundial de Saúde de 2008).

A quimioterapia é o único recurso imediato para reduzir a incidência e prevalência da esquistossomose em áreas endêmicas, uma vez que, até o momento, não existe vacina satisfatória contra este parasita. Atualmente, o praziquantel (PZQ) é o único medicamento recomendado para o tratamento e controle da esquistossomose, mas não mostra atividade contra esquistossômulos e vermes jovens e não evita a reinfecção (Cioli et al., 2004; Utzinger et al., 2003). Além disso, tem sido relatado o desenvolvimento de populações de *Schistosoma* resistentes e/ou tolerantes a PZQ (Cioli et al., 2008, Wang et al., 2010). Isto nos encoraja a contribuir com novos estudos para preservar o PZQ no tratamento da esquistossomose.

β -lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona, β -lap, fig 1), um orto-naftoquinona lipofílico, derivado originalmente obtido a partir das cascas da árvore do lapachol (*Tabebuia avellanedae*) na América do Sul, tem despertado grande atenção por suas amplas atividades farmacológicas, incluindo anti-inflamatória (Sitônio et al. 2012), antibacteriana (Coelho et al., 2010; Lourenço et al., 2011), antiviral (Schuerch e Wehrli, 1978; Li et al., 1993), antifúngica (Medeiros et al., 2010), antimalárica (Andrade-Neto et al., 2004; Pérez-Sacau et al., 2005), tripanocida (Menna-Barreto et al., 2007; Salas et al., 2008; Ferreira et al., 2011) e, especialmente, potenciais anticancerígenos. β -Lap como um novo agente anticancerígeno apresenta atividade antitumoral seletiva contra vários cânceres humanos (Bey et al., 2007; Moon et al., 2010). Ela encontra-se atualmente em ensaios clínicos na fase II em múltiplos ou monoterapia em associação com outros fármacos citotóxicos, tais como a gemcitabina no tratamento de adenocarcinoma pancreático (Rich et al., 2000; Miao et al., 2009).

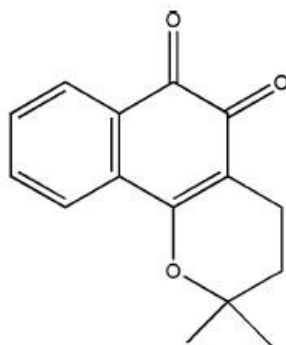


Fig 1 estrutura química da β -lapachona

Neste estudo, descrevemos em modelo murino o efeito da β -lap sobre os diferentes estágios de desenvolvimento de *S. mansoni* (esquistossômulos de pele, esquistossômulos de pulmão, vermes jovens e vermes adultos), com base em critérios parasitológicos e histopatológicos.

Materiais e métodos

Compostos

β -lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona), foi sintetizada a partir do lapachol derivado natural obtido de *T. avellanae* (Bignoneaceae) utilizando ácido sulfúrico de acordo com um método desenvolvido por Cavalcante e colaboradores (2008).

Animais, infecção dos camundongos, protocolo de tratamento e considerações éticas

Camundongos fêmeas Swiss, 30 dias de idade (~30g) foram infectados por via percutânea (Olivier e Stirewalt, 1952) com 50 cercárias de *S. mansoni* (cepa BH) e, em seguida, distribuídos aleatoriamente em grupos de experimentos (10 animais cada) concebidos para avaliar a eficácia da β -lap contra diferentes estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*. A terapia foi iniciada no 1º, 14º, 28º e 45º dias de infecção para avaliar as seguintes fases de desenvolvimento: esquistossômulos de pele, esquistossômulos de pulmão, vermes jovens (antes da oviposição) e vermes adultos (após a oviposição), respectivamente. A terapia foi realizada durante 5 dias consecutivos, por via intraperitoneal na concentração de 50mg/kg/dia. β -lap foi ressuspensa em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO), 1% de Tween 80 e diluídas em solução salina. Cada grupo experimental tratado com a β -lap foi acompanhado por um outro grupo controle que recebeu apenas o veículo do fármaco. Todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical 60 dias após a infecção. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Pernambuco para Experimentação em Animais (CEE/UFPE, 23076.020127/2010-47).

Parâmetros parasitológicos

Recuperação de vermes

Os vermes foram recuperados a partir do sistema portal hepático e dos vasos mesentéricos utilizando a técnica descrita por Smithers e Terry (1965).

A percentagem de redução do número de vermes após o tratamento foi calculado como segue: % de redução = $C - V/C \times 100$. Onde C = o número médio de parasitas obtidos a partir de animais infectados não tratados e V = número médio de parasitas obtidos a partir de animais tratados.

Oograma

Fragmentos de diferentes regiões no intestino delgado foram removidos e usados para avaliar o desenvolvimento e maturação dos ovos de *S. mansoni*, estudado de acordo com a Pellegrino e colaboradores (1962).

Contagem dos ovos em tecido hepático

Para estimar o número de ovos por grama de tecido hepático, uma amostra de fígado, com cerca de 0,3g, foi retirada da parte central remanescente do lobo direito de cada animal e processado separadamente pela técnica de digestão por hidróxido de potássio (KOH) (Cheever 1968).

Estudo histopatológico e histomorfometria

Para cada camundongo perfundido, uma amostra de fígado foi removido a partir da parte central do lobo lateral esquerdo e fixados em formol tamponado a 10%. As amostras foram embebidas em blocos de parafina para obter finas secções histológicas (5µm) que foram coradas com hematoxilina e eosina. Dez campos aleatórios por amostra histológica foram utilizados para a contagem do número médio de granulomas e avaliados histologicamente por microscopia de luz. Vinte granulomas de cada animal contendo um único ovo central foram seleccionados aleatoriamente e utilizados para determinar o diâmetro médio dos granulomas pela mensuração de dois diâmetros perpendiculares ao nível transmiracidial médio do ovo

(Phillips et al., 1977). As imagens foram obtidas usando um microscópio óptico acoplado a uma câmera digital e sistema de computador (Motic Imagens Plus 2.0 MLTM). Todas as avaliações foram realizadas por observadores ``duplo-cegos``.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad Prism 3.02. Os dados foram expressos como a média±DP. Todas as variáveis foram comparadas pelo teste t de Student. Em todos os casos, os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

Resultados

Efeito da beta-lapachona em diferentes estágios de desenvolvimento de S. mansoni

A administração de β -lap em camundongos albergando diferentes estágios de desenvolvimento de *S. mansoni* – esquistossômulos de pele (1 dia após a infecção), esquistossômulos pulmonar (14 dias após a infecção), vermes jovens (28 dias após a infecção) e os vermes adultos (45 dias após a infecção), reduziu significativamente ($p < 0,001$) a carga de vermes totais recuperados em 29,78%, 37,2%, 24,2% e 40,22% em comparação com o controle, respectivamente. Percentagem de redução semelhante também foi alcançada na recuperação de vermes fêmeas para os mesmos esquemas de intervenção terapêutica (tabela 1). Ao analisar o número de ovos por grama de tecido hepático, β -lap induziu significativamente ($p < 0,001$) em 32,71%, 42,07%, 34,64% e 48,01%, quando administrada nos 1º, 14º, 28º e 45º dias após a infecção, respectivamente (Tabela 1).

Em todos os grupos, as amostras de tecido intestinal exibiram ovos de *S. mansoni* em todas as fases do desenvolvimento (dados não apresentados). No entanto, o regime de tratamento utilizado com β -lap em fase de vermes adultos reduziu significativamente ($p < 0,001$) o percentual de ovos imaturos de 56,36% para 36,46% e aumentou de forma significativa ($p < 0,001$) o percentual de ovos maduros de 37,25% para 50,44% e de ovos mortos 6,38% a 13,1% em relação ao controle (Figura 2).

Efeito da beta-lapachona no granuloma esquistossomótico

A análise histológica do tecido hepático de todos os grupos (tratados e não tratados com β -lap) apresentou granulomas típicos com reação inflamatória exsudativa com células do sistema imunológico em torno dos ovos de *S. mansoni* em degeneração (figura 2 a e b). Em todos os subgrupos, a cápsula do fígado estava intacta. Houve uma redução significativa ($p < 0,0001$) no número médio de granulomas hepático ao longo dos grupos tratados com β -lap (tabela 1). No entanto, apenas o grupo tratado 45 dias após a infecção, mostrou redução estatisticamente significativa ($p < 0,001$) de 25,8% no diâmetro médio de granulomas hepático em comparação com o controle (Figura 3c, d).

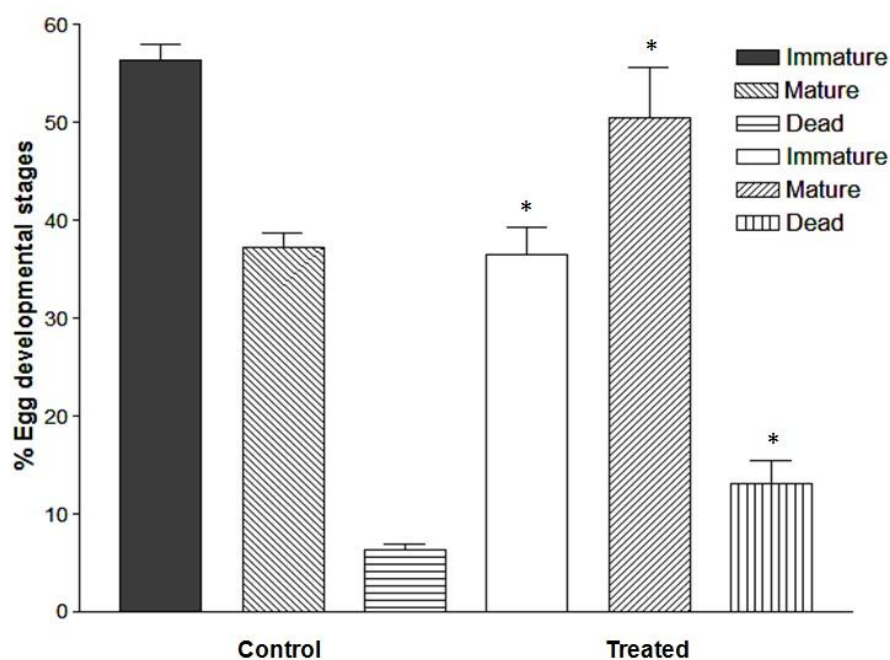


Fig 2 Efeito do tratamento *in vivo* de beta-lapachona sobre o padrão de oviposição de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

Tabela 1 Efeitos do tratamento beta-lapachona (50mg/kg/dia, durante 5 dias consecutivos) em número de vermes, ovos e número médio dos granulomas hepático em camundongos albergando diferentes estágios de desenvolvimento do *S. mansoni*, perfundidos 60 dias após a infecção.

Administração: dias apos infecção/ fase de desenvolvimento	Grupos	Media da carga de vermes			Número de ovos/g de tecido			Granuloma esquistossomótico	
		Total	Redução (%)	Fêmeas	Redução (%)	Fígado×10 ³	Redução (%)	Average number	Redução (%)
1º dia/ esquistossômulo de pele	Tratado	15,63±2,56*	29.78	7,37±1,18**	24.09	8.29±1.23*	32.71	8,87±1,88*	49.6
	Controle	22,29±2,29	-	9,71±1,11	-	12.32±2.42	-	17,6±3,05	-
14º dia/ esquistossômulo pulmonar	Tratado	14,57±1,62*	37.2	6,85±0,89*	37.7	7.31±1.19*	42.07	9,85±2,11*	51.7
	Controle	23,2±2,38	-	11,0±1,0	-	12.62±1.67	-	20,40±2,40	-
28º dia/verme jovem	Tratado	18,17±2,32*	24.7	8,66±1,21*	22.26	9.62±1.27*	34.64	12,0±1,63*	39.39
	Controle	24,14±2,54	-	11,14±1,21	-	14.72±1.62	-	19,8±1,92	-
45º dia/verme adulto	Tratado	13,0±2,44*	40.22	6,0±1,15*	39.2	6.81±0.86*	48.01	8,0±1,41*	58.76
	Controle	21,75±3,95	-	9,87±1,45	-	13.1±2.21	-	19,4±2,4	-

Valores expressos em media de 10 animais ± SD

Grupos foram testados contra seu respectivo controle usando teste de Student's.

* p<0.001

**p<0.01

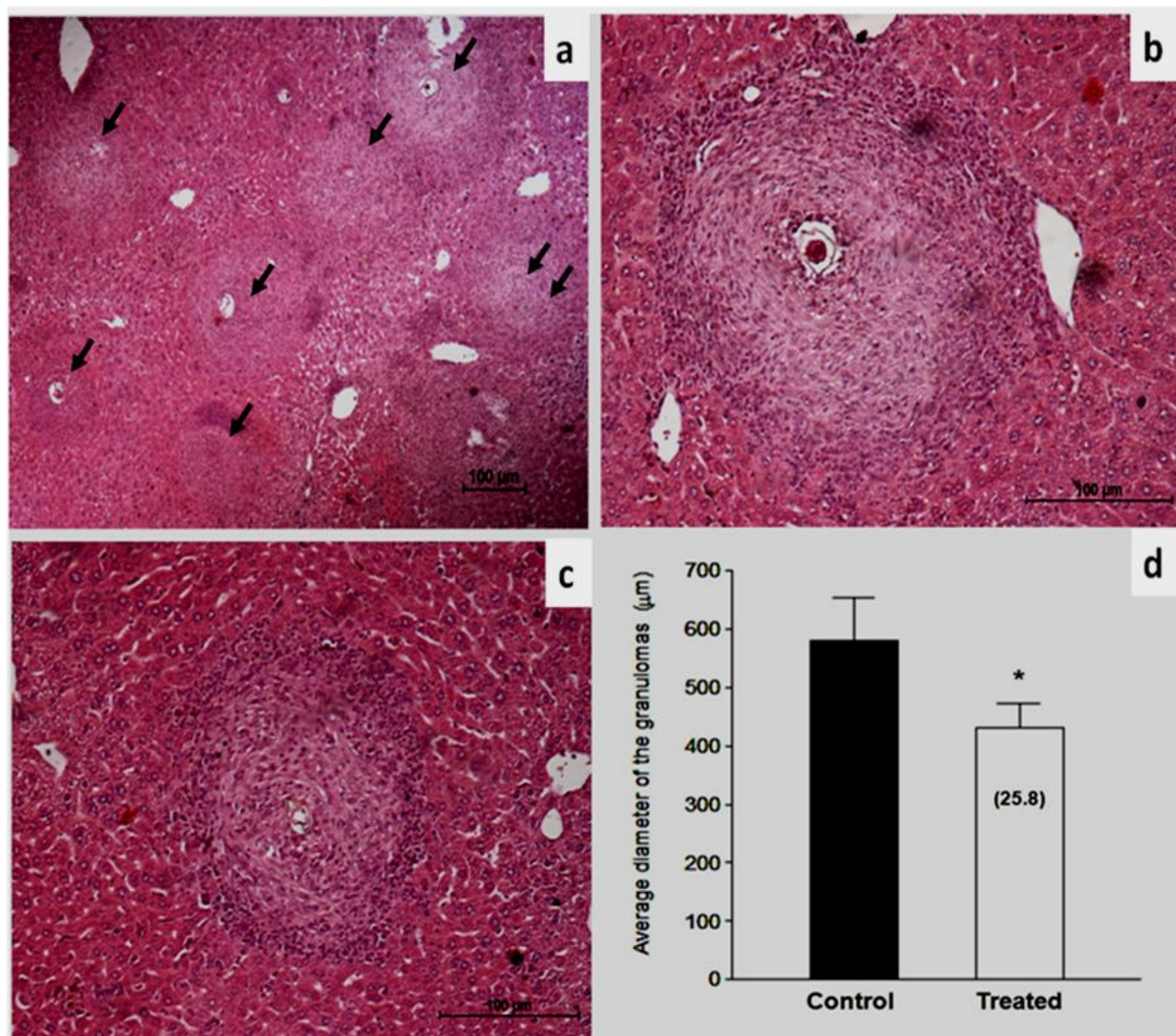


Fig 3 secções histológicas e diâmetro médio de granuloma hepático periovular de camundongos infectados com *S. mansoni*. A imagem a (40x) representa granuloma dos animais não expostos ao tratamento com β -lap (controles), exibindo intenso infiltrado de eosinófilos, neutrófilos, além de poucos macrófagos e linfócitos circundando o ovo central em degeneração. Imagem b (100x) granuloma em maior aumento de a. Imagem c (100x), granuloma de animais tratado com β -lap, aos 45° dia de infecção, circundado por feixes de fibra de colágeno, fibroblastos e poucas células inflamatórias. Imagem d média do diâmetro de gramulomas de animais tratados com β -lap, aos 45° dia de infecção ($p < 0.001$).

Discussão

Atualmente o praziquantel (PZQ) é a única droga responsável em reduzir a morbidade e mortalidade causada pelo *Schistosoma* (Lammie, Fenwick e Utzinger, 2006; King, 2009). Por esta razão, a OMS incluiu a esquistossomose no Programa de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais Negligenciadas, cujo objetivo é incentivar a pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos (Attallah et al., 2008; Abdul-Ghani et al., 2009; Mulvenna et al., 2010). Atualmente, mais de 100 milhões de pessoas estão sendo tratados com PZQ. A grande demanda no seu uso tem sido verificada não apenas pela elevada prevalência, mas por inúmeros casos de reinfecção, que são retratados em base anual ou semestral (Hotez 2006). Este cenário indica o desenvolvimento de parasitas resistentes e, conseqüentemente, a um colapso no tratamento desta doença. Assim, é prudente procurar novas terapêuticas, e as recentes discussões concentraram-se em despertar a necessidade de buscar alternativas para PZQ.

As quinonas constituem uma ampla e variada família de metabolitos que são encontrados na natureza. Em termos de estrutura molecular, as quinonas podem ser divididas de acordo com o tipo de sistema aromático que sustém o anel quinônico: benzoquinonas - um anel de benzeno; naftoquinonas - um anel de naftaleno; antraquinonas - um anel antraceno linear ou angular. A β -lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona, β -lap), é uma naftoquinona lipofílica, análoga semi-sintética do lapachol encontrado em *Tabebuia avellaneda* (conhecida popularmente por Ipê roxo), planta da família Bignoneaceae comumente encontrada em muitas regiões do Brasil. Sem dúvida, β -lap é caracterizada por apresentar atividade *in vivo* e *in vitro* contra uma série de linhagem de células tumorais e inibir tumores resistentes a terapia convencional, particularmente os neoplasmas de proliferação com ciclo celular lento (Park et al., 2005, Suzuki et al., 2006; Moon et al., 2010).

Compostos com atividade esquistossomicida podem ser eficazes em formas diferentes: profilaticamente (causando a morte dos esquistossômulos), supressivamente (inibindo a oviposição) e curativamente (causando a morte do verme adulto) (Moraes et al., 2011). Este é o primeiro relato do efeito anti-helmíntico de β -lap sobre esquistossômulos de pele, esquistossômulos pulmonar, vermes jovens e vermes adultos de *S. mansoni* em modelo murino. Para esta avaliação utilizamos a linhagem BH, nativa de Minas Gerais, que predomina em regiões endêmicas do Brasil, (Zuim et al., 2012) país com cerca de seis milhões de pessoas

infectadas e outros 25 milhões em risco permanente de contrair a esquistossomose (Lambertucci, 2010).

Quando uma droga suprimir a postura de ovos, o oograma deve apresentar um maior percentual de ovos maduros, como resultado de posturas anteriores. Isso ocorreu em nosso estudo quando camundongos albergando vermes adultos foram tratados com lap- β . Neste grupo, houve troca percentual significativa ($p < 0,001$) entre ovos imaturos e maduro, e aumento ovos mortos. Nos outros grupos experimentais não β -lap modifica o oograma, desde o período de intervenção ocorreu em fases de esquistossômulos e fêmeas imaturas (dados não mostrados).

A redução ($p < 0,001$) na carga de ovos e granulomas no tecido hepático induzida pela β -lap pode ser atribuída sua atividade esquistossomicida sobre vermes fêmeas em diferentes fases (tabela 1). Este efeito resulta no menor número de reações granulomatosas hepática e fibrose no decurso da infecção. β -lap também reduziu significativamente o tamanho dos granulomas hepáticos, quando a intervenção ocorreu concomitantemente a maturação completa do sexo feminino, a oviposição já iniciada e acúmulo de ovos em tecido hepático. Neste estágio da infecção o granuloma é uma reação de hipersensibilidade tardia mediada por células TCD₄⁺ (Pearce e Macdonald, 2002). Estas células desencadeiam resposta Th1, com a ativação de macrófagos e síntese subsequente de IL-2, IL-6, TNF- α e IFN- γ , o óxido nítrico (NO) e citrulina, determinando a extensão da inflamação (Modolell et al., 1995; Wynn e Cheever, 1995). No nosso estudo, a redução no tamanho do granuloma pode ser atribuído à atividade anti-inflamatória de β -Lap, que inibe a migração de neutrófilos e reduz a síntese de TNF- α , IL-6, NO e NO-sintetase (Liu et al., 1999, Tzeng et al., 2003, Sitônio et al., 2012). Assim, sugerimos que β -Lap modula favoravelmente a resposta imune granulomatosa e que a intervenção terapêutica por um período mais longo, pode resultar em uma resolução granulomatosa precoce. Associado ao PZQ, este efeito terapêutico pode ser potencializado uma vez que o tratamento experimental e clínico da esquistossomose com PZQ é capaz de reduzir o tamanho dos granulomas, aparentemente devido à redução do infiltrado celular (Zilton 2005; Aires et al., 2012).

β -Lap está recebendo uma enorme atenção por possuir potentes atividades terapêuticas em várias doenças, incluindo câncer, diabetes, obesidade e doenças cardiovasculares (Dong et al., 2009; Hwang et al., 2009; Kim et al., 2009). Além disso, β -lap possui atividade

antimalárica *in vitro* e *in vivo* contra cepas sensíveis e resistentes à cloroquina (Andrade-Neto 2004; Pérez-Sacau et al., 2005), anti-*Trypanosoma cruzi* (Menna-Barreto et al., 2007; Salas et al., 2008; Ferreira et al., 2011), antifúngica (Medeiros et al., 2010), contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (Coelho et al., 2010; Lourenço et al., 2011; Kenneth et al., 2012) e inibi a replicação do vírus HIV-1 (Li et al., 1993).

Sugere-se que estas atividades biológicas de β -lap se deve por suprimir a atividade da topoisomerase DNA e comprometimento do reparo do DNA através de espécies reativas de oxigênio (ROS) gerados via NAD (P) H: oxidorreductase quinino 1 (Krishnan e Bastow, 2000; Reinicke et al., 2005; Bey et al., 2007; Siew et al., 2012). No entanto, a informação sobre o seu mecanismo de atividade esquistossomicida ainda não é compreendido. A propósito, é bem conhecido que a geração de ROS pode induzir citotoxicidade e lesões tisulares. O aumento das ROS e H_2O_2 , esgota a reserva de glutathione por oxidação da glutathione reduzida (GSH) a glutathione oxidada (GSSG). Isto pode alterar as atividades de enzimas ou de proteínas vitais do *S. mansoni*, resultando em peroxidação de lípidios e desorganização protéica, alterando a capacidade dos parasitas se protegerem contra os radicais livres, resultando em sua morte (Azza et al., 2005; Kuntz et al., 2007; Seif el-Din et al., 2011). Assim, mecanismos antioxidantes de defesa dos vermes pode representa um alvo potencialmente bom para a quimioterapia (Azza et al., 2005).

O efeito mais evidente de ROS sobre o esquistossoma, é a superfície do parasita (Mei et al., 1996). O tegumento do esquistossoma contém numerosas mitocôndrias, o que poderia ser o alvo principal de β -lap. A β -lap afeta a função mitocondrial por oxidação no ciclo redox (Witte, Stoppani e Dubin, 2004), induzindo fragmentação internucleossomal do DNA, a libertação do citocromo c, e ativação de caspase-3 (Li et al., 1999; Li et al., 1999; Menna -Barreto et al., 2007; Salas et al., 2008). Recentemente, Lorsuwannarat e colaboradores (2013) sugerem estes mecanismos como via de ação da 5-hidroxi-2-metil-1,4-naftoquinona, conhecido como plumbagin, contra vermes adultos de *S. mansoni*. Segundo Zhai e colaboradores (2002) vermes adultos maduros de *S. mansoni* têm maior efeito anti-radicaís livres de oxigênio e toxicidade bioquímica do que vermes juvenis, levando a taxa de mortalidade de vermes juvenis ser maior do que a de vermes adultos maduros. No entanto, β -lap agiu de forma semelhante em todos os estágios de desenvolvimento avaliados aqui.

Ao contrário do PZQ, que promove o aumento da permeabilidade das membranas das células do esquistossoma através do cálcio, promovendo a contração muscular sustentada, paralisia espástica e dano do tegumento (Doenhoff et al., 2008 e 2009), β -Lap em células tumorais e ileo promove o efluxo deste íon, sugerindo que o aumento do Ca^{2+} no plasma seja responsável pelo seu efeito apoptótico (Tagliarino et al., 2001; Bentle et al., 2006). Este efeito antagônico, torna-se alvo importante alvo para futuras pesquisas com β -lap em canais de cálcio de *S. mansoni*.

As naftoquinonas, incluindo β -lap, têm se mostrado ativas contra outras fases no desenvolvimento de *S. mansoni*. Pinto e colaboradores (1997) avaliaram derivados naftoquinonas que pudessem inibir topicamente a penetração de cercárias de *S. mansoni*. Dos derivados estudados, 15 naftoquinonas bloquearam a penetração de cercárias quando aplicados nas caudas dos camundongos 24 horas antes da infecção via caudal. No grupo exposto a β -lap o bloqueio foi de 100%. No presente estudo a administração da β -lap 24 horas após exposição cercariana reduziu a carga de vermes. Estudos concluem que formulações tópicas que bloqueiam a penetração cercariana podem ser usadas como drogas profiláticas em regiões endêmicas (Pinto et al., 1997; Wulff, Haeberlein e Hass, 2007; Kasny et al., 2007; Haas et al., 2008). Além disso, os derivados naftoquinonas também são ativos contra hospedeiro intermediário do *S. mansoni*. Estes compostos matam caramujos adultos e a desova de *B. glabrata* (Dos Santos et al., 2000; Lima et al., 2002a; Lima et al., 2002b; Camara et al., 2008; Ribeiro et al., 2009).

Devido a limitada solubilidade aquosa da β -lap (Lindenberg et al., 2004) formulações vem sendo desenvolvidas a fim de garantir maior biodisponibilidade e atividade biológica, utilização de menores doses e de via de administração mais conveniente além de menores efeitos adversos. Neste contexto, β -lap complexada em ciclodextrina demonstra sinais promissores em estudo clínicos antitumorais de fase I, II e III (Li 2006; Khong et al, 2007, Yang et al. 2008). Diante da moderada atividade da β -lap contra *S. mansoni*, o emprego de novas formulações abrem perspectivas de estudos que visem aumentar sua atividade e elucidar seu mecanismo de ação, além de utilizá-la como protótipo para a síntese de novos derivados naftoquinônicos com potencial esquistossomicida.

Agradecimento: Este trabalho recebeu suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq - Brasil, Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (FACEPE) and Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

Referências

1. Abdul-Ghani, R.A., Loutfy, N., Hassan, A., 2009. Experimentally promising antischistosomal drugs: a review of some drug candidates not reaching the clinical use. *Parasitol. Res.* 105, 899-906.
2. Aires, A.L., Albuquerque, M.C.P.A., Silva, R.A.R., Schirato, G.V., Filho, N.T.P., Araújo, S.B., Souza, V.M.O., Costa, V.M.A., Malagueño, E., 2012. Immunohistopathological changes in murine Schistosomiasis mansoni under the influence of N-acetyl-L-cysteine. *Parasitol. Res.* 4, 1569-1578.
3. Andrade-Neto, V.F., Goulart, M.O.F., Silva-Filho, J.F., Silva, M.J., Pinto, M.C.F.R., Pinto, A.V., Zalis, M.G., Carvalho, L.H., Krettli, A.U., 2004. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* in vitro and *Plasmodium berghei* in vivo. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 1145–1149.
4. Attallah, A.M., Wahba, M.A., Elsheikha, H.M., Abbas, A.T., Abdel A.M.M., El-hemaly, M.A., 2008. Outcomes of *Schistosoma mansoni* infection in outbred albino mice exposed to Larvin contaminant. *Parasitol. Res.* 103, 567–576.
5. Azza, M.M., Nadia, M.M., Sohair, S.M., 2005. *Sativa* seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100, 205-211.
6. Bentle, M.S., Reinicke, K.E., Bey, E.A., Spitz, D.R., Boothman, D.A., 2006. Calcium-dependent modulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair. *J. Biol. Chem.* 281, 33684-33696.
7. Bey, E.A., Bentle, M.S., Reinicke, K.E., Dong, Y., Yang, C.R., Girard, L., Minna, J.D., Bornmann, W.G., Gao, J., Boothman, D.A., 2007. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by beta-lapachone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 28, 11832-11837.
8. Camara, C.A., Silva, T.M.S., Silva, T.G., Martins, R.M., Barbosa, T.P., Pinto, A.C., Vargas, M.D., 2008. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-[1,4]naphthoquinone and derivatives. *Anais da Academia Bras. Ciências* 80, 329-334.
9. Cavalcante, F.A., Silva, J.L.V., Carvalho, V.M.N., Camara, C.A., Silva, T.M., Pinto, A.C., et al. 2008. Spasmolytic activity of lapachol and its derivatives, alpha and beta-lapachone, on the guinea-pig ileum involves blockade of voltage-gated calcium channels. *Rev. Bras. Farmacog.* 18, 183–189.
10. Cheever, A.W., 1968. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull. World. Health. Organ.* 39, 328–331.

11. Cioli, D., Botros, S.S., Wheatcroft-Francklow, K., Mbaye, A., Southgate, V., Tchuente, L.A., Pica-Mattoccia, L., Troiani, A.R., El-Din, S.H., Sabra, A.N., Albin, J., Engels, D., Doenhoff, M.J., 2004. Determination of ED₅₀ values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *Int. J. Parasitol.* 34, 979–987.
12. Cioli, D., Valle, C., Angelucci, F., Miele, A.E., 2008. Will new antischistosomal drugs finally emerge? *Trends. Parasitol.* 24, 379–382.
13. Coelho, T.S., Silva, R.S., Pinto, A.V., Pinto, M.C., Scaini, C.J., Moura, K.C., Almeida, S.P., 2010. Activity of β -lapachone derivatives against rifampicin-susceptible and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 90.293-297.
14. Doenhoff, M.J., Hagan, P., Cioli, D., Southgate, V., Pica-Mattoccia, L., Botros, S., Coles, G., Tchuem, T.L.A., Mbaye, A., Engels, D., 2009. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology* 136, 1825–1835.
15. Doenhoff, M.J., Cioli, D., Utzinger, J., 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 659-67.
16. Dong, Y., Chin, S.F., Blanco, E., Bey, E.A., Kabbani, W., Xie, X.J., Bornmann, W.G., Boothman, D.A., Gao, J., 2009. Intratumoral delivery of beta-lapachone via polymer implants for prostate cancer therapy. *Clin. Cancer. Res.* 15, 131-139.
17. Dos Santos, A.F., Ferraz, P.A.L., Pinto, A.V., Pinto, M.C.R.F., Goulart, M.O.F., Sant'Ana, A.E.G., 2000. Molluscicidal activity of 2-hydroxy-3-alkyl-1,4-naphthoquinones and derivatives. *Int. J. Parasitol.* 30, 1199-1202.
18. Ferreira, S.B., Salomão, K., Silva, F.C., Pinto, A.V., Kaiser, C.R., Pinto, A.C., Ferreira, V.F., Castro, S.I., 2011. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone analogues. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 3071–3077.
19. Haas, W., Haeberlein, S., Behring, S., Schönamsgrubner, E., Zopelli, E., 2008. *Schistosoma mansoni*: human skin ceramides are a chemical cue for host recognition of cercariae. *Exp. Parasitol.* 120, 94-97.
20. Hotez, P.J., Molyneux, D.H., Fenwick, A., Ottesen, E., Ehrlich, S.S., et al. 2006. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS. Med.* 3, e102. doi:10.1371/journal.pmed.0030102.
21. Hwang, J.H., Kim, D.W., Jo, E.J., Kim, Y.K., Jo, Y.S., Park, J.H., Yoo, S.K., Park, M.K., Kwak, T.H., Kho, Y.L., et al. 2009. Pharmacological stimulation of NADH oxidation ameliorates obesity and related phenotypes in mice. *Diabetes* 58, 965–974.
22. Kasny, M., Mikes, L., Dalton, J.P., Mountford, A.P., Horak, P., 2007. Comparison of cysteine peptidase activities in *Trichobilharzia regenti* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 134, 1599–1609.

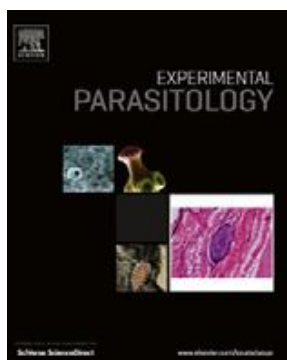
23. Kenneth, O.E., Senthil, P.K., Victor, K., Gabriel, N.F., Henrietta, L., Marion, J.J.M., Namrita, L., Sundarababu, B., 2012. Cobalt mediated ring contraction reaction of lapachol and initial antibacterial evaluation of naphthoquinones derived from lapachol. *Med. Chem. Res.* 21, 2117–2122.
24. Khong, H.T., Dreisbach L., Kindler, H.L., Trent, D.F., Jeziorski, K.G., Bonderenko, I., et al., 2007. A phase 2 study of ARQ 501 in combination with gemcitabine in adult patients with treatment naïve, unresectable pancreatic adenocarcinoma. *Proceedings ASCO Annual Meeting*, Chicago, USA. 1-5, 15017.
25. Kim, S.Y., Jeoung, N.H., Oh, C.J., Choi, Y.K., Lee, H.J., Kim, H.J., Kim, J.Y., Hwang, J.H., Tadi, S., Yim, Y.H., et al. 2009. Activation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 prevents arterial restenosis by suppressing vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ. Res.* 104, 842– 850.
26. King, C.H., 2009. Toward the elimination of schistosomiasis. *N. Engl. J. Med.* 360, 106–109,
27. Krishnan, P., Bastow, K.B., 2000. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by Pyranonaphthoquinone derivatives – Eleutherin, α lapachone and β lapachone. *Biochemical Pharmacology* 60, 1367-1379.
28. Kuntz, A.N., Davioud-Charvet, E., Sayed, A.A., Califf, L.L., Dessolin, J., et al. 2007. Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: An Essential Parasite Enzyme and a Key Drug Target. *PLoS. Med.* 4:e206. doi:10.1371/journal.pmed.0040206.
29. Lambertucci, J.R., 2010. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz* 105, 422-435.
30. Lammie, P.J., Fenwick, A., Utzinger, J., 2006. A blueprint for success: integration of neglected tropical disease control programmes. *Trends. Parasitol.* 22, 313–321.
31. Li, C., Nemunaitis, J., Senzer, N., Edelman, G., Glasner, S., Dombal, G., Douvholuk, A., Cunningham, C., 2006. A phase Ib trial of ARQ 501, a selective checkpoint activator, in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *J. Clin. Oncol.* 24, 13053.
32. Li, C.J., Li, Y.Z., Pinto, A.V., Pardee, A.B., 1999. Potent inhibition of tumor survival in vivo by β -lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. *PNAS.* 23, 13369–13374.
33. Li, C.J., Zhang, L.J., Dezube, B.J., Crumpacker, C.S., Pardee, A.B., 1993. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. *Medical Sci.* 90, 1839-1842.
34. Li, Y.Z., Li, C.J., Pinto, A.V., Pardee, A.B., 1999. Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by β -lapachone in human carcinoma cells. *Molecular Medicine.* 5, 232-239.

35. Lima, N.M.F., Correia, C.S., Ferraz, P.A.L., Pinto, A.V., Pinto, M.C.R.F., Sant'Ana, A.E.G., Goulart, M.O.F., 2002b. Molluscicidal hydroxynaphthoquinones and derivatives. Correlation between their redox potentials and activity against *Biomphalaria glabrata*. J. Braz. Chem. Soc. 13, 822-829.
36. Lima, N.M.F., Santos, A.F., Porfírio, Z., Goulart, M.O.F., Santana, A.E.G., 2002a. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotic*. Acta Tropica 83, 43-47.
37. Lindenberg, M., Koop, S., Dressman, J.B., 2004. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. Eur. J. Pharm. Biopharm. 58, 265-278.
38. Liu, S.H., Tzeng, H.P., Kuo, M.L., Lin-Shiau, S.Y., 1999. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by β -lapachone in rat alveolar macrophages and aorta. Br. J. Pharmacol. 126, 746-750.
39. Lorsuwannarat, N., Saowakon, N., Ramasoota, P., Wanichanon, C., Sobhon, P., 2013. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. Exp. Parasitol. 133, 18-27.
40. Lourenço, A.L., Abreu, P.A., Leal, B., Silva, J.E.N., Pinto, A.V., Pinto, M.C., Souza, A.M., Novais, J.S., Paiva, M.B., Cabral, L.M., Rodrigues, C.R., Ferreira, V.F., Castro, H.C., 2011. Identification of nor- β -lapachone derivatives as potential antibacterial compounds against *Enterococcus faecalis* clinical strain. Curr. Microbiol. 62, 684-689.
41. Medeiros, C.S., Pontes-Filho, N.T., Camara, C.A., Lima-Filho, J.V., Oliveira, P.C., Lemos, A.S., Leal, A.F.G., Brandão, J.O.C., Neves, R.P., 2010. Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. Braz. J. Med. Biol. Res. 43, 345-349.
42. Mei, H., Thakur, A., Schwartz, J., LoVerde, P.T., 1996. Expression and characterization of glutathione peroxidase activity in the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. Infect. Immun. 64, 4299-4306.
43. Menna-Barreto, R.F.S., Corrêa, J.R., Pinto, A.V., Soares, M.J., Castro, S.L., 2007. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. Parasitol Res 101:895-905.
44. Miao, X.S., Zhong, C., Wang, Y., Savage, R.E., Yang, R.Y., Kizer, D., Volckova, E., Ashwell, M.A., Chan, T.C., 2009. *In vitro* metabolism of beta-lapachone (ARQ 501) in mammalian hepatocytes and cultured human cells. Rapid. Commun. Mass. Spectrom. 23, 12-22.
45. Modolell, M., Corraliza, I.M., Link, F., Soler, G., Eichmann, K., 1995. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone-marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. Eur. J. Immunol. 25, 1101-1104.

46. Moon, D.O., Kang, C.H., Kim, M.O., Jeon, Y.J., Lee, J.D., Choi, Y.H., Kim, G.Y., 2010. β -Lapachone (LAPA) decreases cell viability and telomerase activity in leukemia cells: suppression of telomerase activity by LAPA. *J. Med. Food.* 13, 481–488.
47. Moraes, J., Nascimento, C., Lopes, P.O., Nakano, E., Yamaguchi, L.F., Kato, M.J., Kawano, T., 2011. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. *Exp. Parasitol.* 127, 357–364.
48. Mulvenna, J., Moertel, L., Jones, M.K., Nawaratna, S., Lovas, E.M., Gobert, G.N., Colgrave, M., Jones, A., Loukas, A., Mcmanus, D.P., 2010. Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument. *Int. J. Parasitol.*, 40, 543–554.
49. Neghina, R., Neghina, A.M., Merkler, C., Marincu, I., Moldovan, R., Iacobiciu, I., 2009. Intestinal schistosomiasis, importation of a neglected tropical disease in Romania: case report of a traveler to endemic regions. *Travel Med. Infect. Dis.* 7, 49–51.
50. Olivier, L., Stirewalt, M.A., 1952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *S.mansoni*. *J. of Parasitology* 38, 19–23.
51. Park, H.J., Ahn, K.J., Ahn, S.D., Choi, E., Lee, S.W., et al., 2005. Susceptibility of cancer cells to β -lapachone is enhanced by ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 61, 212–219.
52. Pearce EJ, Macdonald AS 2002. The immunobiology of Schistosomiasis. *Nat Rev Immunol* 7:499–511
53. Pellegrino, J., Oliveira, C.A., Faria, J., Cunah, A.S., 1962. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 11, 201–215.
54. Pérez-sacau, E., Estévez-braun, A., Ravelo, A.G., Gutiérrz, Y.D., Giménez, T.A., 2005. Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and beta-lapachone. *Chem. Biodivers.* 2, 264-74.
55. Phillips, S.M., DiConza, J.J., Gold, J.A., Reid, W.A., 1977. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse. I. Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation, and host morbidity. *J. Immunol.* 118, 594–599.
56. Pinto, A.V., Pinto, M.C.R., Gilbert, B., Pellegrino, J., Mello, R.T., 1997. *Schistosoma mansoni* blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: I. Naphthoquinones and derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 133–135
57. Reinicke, K.E., Bey, E.A., Bentle, M.S., Pink, J.J., Ingalls, S.T., Hoppel, C.L., Misico, R.I., Arzac, G.M., Burton, G., Bornmann, W.G., et al., 2005. Development of beta-lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1 levels. *Clin. Cancer. Res.* 11, 3055–3064.
58. Ribeiro, K.A.L., Carvalho, C.M., Molina, M.T., Lima, E.P., Lópezmontero, E., Reys, J.R.M., Oliveira, M.B.F., Pinto, A.V., Sant’ana, A.E.G., Goulart, M.O.F., 2009. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica*, 111, 44-50.

59. Rich, T., Allen, R.L., Wyllie, A.H., 2000. Defying death after DNA damage. *Nature*. 407, 777–83.
60. Salas C, Tapia RA, Ciudad K, Armstrong V, Orellana M, Kemmerling U, Ferreira J, Maya JD, Morello A (2008) *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg Med Chem* 16:668-674.
61. Schuerch, A.R., Wehrli, W., 1978. β -Lapachone, an Inhibitor of Oncornavirus Reverse Transcriptase and Eukaryotic DNA Polymerase- α . *Eur. J. Biochem.* 84, 197-205.
62. Seif el-Din, S.H., Al-Hroob, A.M., Ebeid, F.A., 2011. *Schistosoma mansoni*: N-acetylcysteine downregulates oxidative stress and enhances the antischistosomal activity of artemether in mice. *Exp. Parasitol.* 128, 230–235.
63. Siew, E.L., Chan, K.M., Williams, G.T., Ross, D., Inayat-Hussain, S.H., 2012. Protection of hydroquinone-induced apoptosis by downregulation of FAU is mediated by NQO1. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 1616-1624.
64. Sitônio, M.M., Júnior, C.H.R.C., Campos, I.A., Silva, J.B.N.F., Lima, M.C.A., Góes, A.J.S., Maia, M.B.S., Rolim, P.J.N., Silva, T.G. 2012. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione (b-lapachone). *Inflamm. Res.* 62, 107-113.
65. Smithers, S.R., Terry, R.J., 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 55, 695–700.
66. Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., Utzinger, J., 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect. Dis.* 6, 411–425.
67. Suzuki, M., Amano, M., Choi, J., Park, H.J., Williams, B.W., Ono, K., Song, C.W., 2006. Synergistic effects of radiation and beta-lapachone in DU-145 human prostate cancer cells *in vitro*. *Radiat. Res.* 165, 525-531.
68. Tagliarino, C., Pink, J.J., Dubyak, G.R., Nieminen, A.L., Boothman, D.A., 2001. Calcium is a key molecule in β -lapachone-mediated cell death. *J. Bio. Chem.* 276, 19150-19159.
69. Tzeng, H.P., Ho, F.M., Chao, K.F., Kuo, M.L., Lin-Shiau, S.Y., Liu, S.H., 2003. Beta-Lapachone reduces endotoxin-induced macrophage activation and lung edema and mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 85–91.
70. Utzinger, J., Keiser, J., Shuhua, X., Tanner, M., Singer, B.H., 2003. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47, 1487–1495.
71. Wang, W., Dai, J.R., Li, H.J., Shen, X.H., Liang, Y.S., 2010. Is there reduced susceptibility to praziquantel in *Schistosoma japonicum*? Evidence From China. *Parasitology*. 137, 1905–1912.

72. Witte, N.V., Stoppani, A.O., Dubin, M., 2004. 2-Phenyl-beta-lapachone can affect mitochondrial function by redox cycling mediated oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 15, 129-35.
73. World Health Organization (WHO), 2008. The Social Context of Schistosomiasis and its Control: An Introduction and Annotated Bibliography. Birgitte Bruun, Jens Aagaard-Hansen.
74. Wulff, C., Haeberlein, S., Haas, W., 2007. Cream formulations protecting against cercarial dermatitis by *Trichobilharzia*. *Parasitol. Res.* 101, 91–97.
75. Wynn, T.A., Cheever, A.W., 1995. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Current Opinion in Immunology*, Philadelphia, 7, 505-511.
76. Yang, R.Y., Kizer, D.K., Wu, H., Volckova, A.E., Miao, X.S., Ali, S.M., 2008. Synthetic methods for the preparation of ARQ 501 (β -Lapachone) human blood metabolites. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 5635-5643.
77. Zhai, Z.L., Jiao, P.Y., Mei, J.Y., Xiao, S.H., 2002. Glutathione inhibits the antischistosomal activity of artemether. *Chin. J. Parasitol. Parasit. Dis.* 20, 212–215.
78. Zilton, A.A., 2005. Regressão da fibrose hepática. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38, 514-520.
79. Zuim, N.R.B., Allegretti, S.M., Linhares, A.X., Magalhães, L.A., Zanotti-Magalhães, E.M., 2012. A Study of the Granulomatous Responses Induced by Different Strains of *Schistosoma mansoni*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. doi:10.1155/2012/953524.



β -Lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b]pyran-5,6-dione) against different stages of the *Schistosoma mansoni* in mice

André de Lima Aires^{a,b},

Eulália Camelo Pessoa Azevedo Ximenes^c,

Vanessa Xavier Barbosa^c,

Alexandre José da Silva Góes^c,

Valdênia Maria Oliveira Souza^a,

Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque^{a,b*}

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

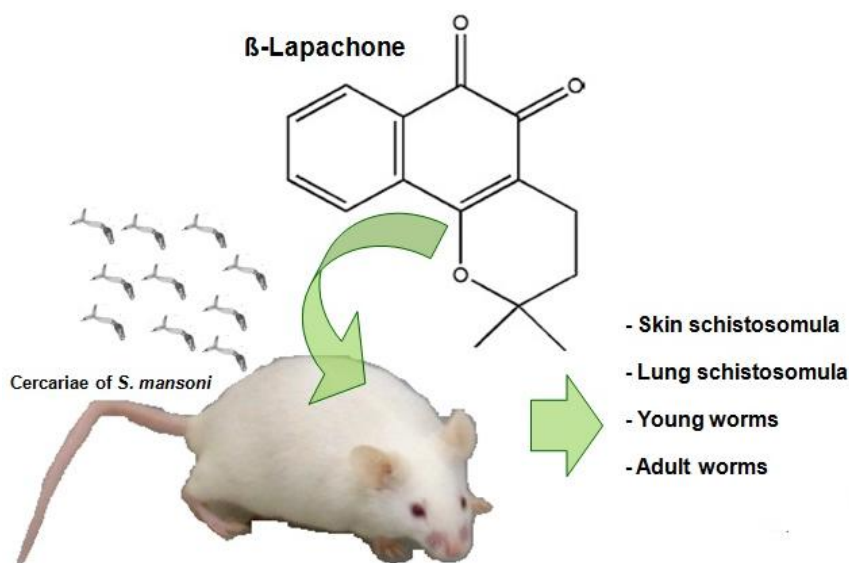
^bCentro de Ciências da Saúde - Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

^cCentro de Ciências Biológicas - Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

Highlights

- β -Lap is active against different stages of *S. mansoni*.
- β -Lap reduces the overall worm burden and the number of female worms.
- β -Lap reduces the number of eggs and granulomas in liver tissue.
- β -Lap reduces the size of hepatic granulomas and changes the oogram pattern.
- Production of ROS and subsequent action on mitochondria could be the main target of β -Lap.

Graphical abstract



Palavras-chaves : β -lapachona, modelo murino, estágios evolutivos do *S. mansoni*

Abstract

The activity of β -Lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H- naphthol [1,2-b] pyran-5,6-dione, β -Lap) against stages different of *Schistosoma mansoni* was investigated in mice. Mice infected with 50 cercariae (BH strain) were treated intraperitoneally at a dose of 50 mg/kg for 5 consecutive days, starting on the 1st, 14th, 28th and 45th day after infection, to evaluate the effect of β -Lap on skin schistosomula, lung schistosomula, young worms (that is, before oviposition) and adult worms (that is, after oviposition), respectively. All animals were euthanized by cervical dislocation 60 days after infection. β -Lap significantly reduced ($p < 0.001$) the number of worms in 29.78%, 37.2%, 24.2% and 40.22% when administered during the skin schistosomula, lung schistosomula, young worms and adult worms phases, respectively. Significant reduction was also achieved in terms of female burden. In all groups, there was significant reduction in the number of eggs and granulomas in liver tissue. When the intervention was performed during the adult worms phase, β -Lap reduced the size of hepatic granulomas and also lowered the percentage of immature eggs and increased the percentage of mature and dead eggs. Our data indicate that β -Lap has moderate antischistosomal properties. Its molecule may also be used as a prototype for synthesis of new naphthoquinone derivatives with potential schistosomicidal properties. Further studies with different formulations containing β -Lap are needed to clearly establish the best dose and route of administration and its mechanism of action against schistosomes.

Keywords β -lapachone, schistosomicidal, *in vivo*, granuloma

Introduction

Schistosomiasis is a chronic and debilitating disease caused by worms of the genus *Schistosoma*. The infection is potentially life-threatening with severe pathological manifestations in the hepato-splenic system and gastrointestinal tract (Neghina et al., 2009). It is included on the World Health Organization (WHO)'s list of neglected diseases and has a significant economic and social impact. It is estimated that 779 million people are at constant risk of infection and 207 million are infected, of whom 120 million are symptomatic, 20 million develop the chronic form and more than 500,000 die each year (Steinmann et al., 2006; World Health Organization 2008).

Chemotherapy is the only immediate recourse for reducing the incidence and prevalence of schistosomiasis in endemic areas, since, to date, there is no satisfactory vaccine against the parasite. At present, praziquantel (PZQ) is the only drug recommended for the treatment and control of schistosomiasis, although it is not active against schistosomula and young worms and does not prevent reinfection (Cioli et al., 2004; Utzinger et al., 2003). Furthermore, the development of populations of *Schistosoma* resistant and/or tolerant with regard to PZQ has been reported (Cioli et al., 2008; Wang et al., 2010). This has encouraged us to contribute new studies to preserve the PZQ in the treatment of schistosomiasis.

β -Lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b] pyran-5,6-dione, β -Lap, figure 1), a lipophilic ortho-naphthoquinone derivative originally obtained from the bark of the lapachol tree (*Tabebuia avellanedae*) in South America, has aroused great attention for its wide-ranging pharmacological properties, including anti-inflammatory (Sitônio et al., 2012), antibacterial (Coelho et al., 2010; Lourenço et al., 2011), antiviral (Schuerch and Wehrli, 1978; Li et al., 1993), antifungal (Medeiros et al., 2010), antimalarial (Andrade-Neto et al., 2004; Pérez-Sacau et al., 2005), trypanocidal (Menna-Barreto et al., 2007; Salas et al., 2008; Ferreira et al., 2011) and especially powerful anticancer activity. β -Lap as a novel anticancer agent exhibits selective antitumor activity against various human cancers (Bey et al., 2007; Moon et al., 2010). It is currently in multiple phase II clinical trials as a monotherapy and in combination with other cytotoxic drugs, such as gemcitabine for the treatment of pancreatic adenocarcinoma (Rich et al., 2000; Miao et al., 2009).

Here fig 1

In this study we describe the effect of β -lap on the different developmental stages of *S. mansoni* (skin schistosomula, lung schistosomula, young worms and adult worms) based on parasitological and histopathological criteria in a model using mice.

Materials and methods

Compounds

β -Lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b] pyran-5,6-dione) was synthesized from lapachol naturally found in *Tabebuia avellanedae* (Bignoneaceae) using sulfuric acid according to a method developed by Cavalcante and colleagues (2008).

Animals, Infection of mice, treatment protocol and ethical considerations

Mice were obtained and kept in the Immunopathology Laboratory Keizo Asami pound in a controlled environment (temperature between 20 $\pm$ 2°C, 12 hour daylight cycle) with free access to food (Labina ® / Purina, São Paulo-SP) and water ad libitum. After approval by the Animal Experiments Ethics Committee of the UFPE (23076.020127/2010-47), Female 30-day old Swiss mice (~ 30g) were percutaneously infected (Olivier and Stirewalt, 1952) with 50 cercariae of *S. mansoni* (BH strain) and then randomly allocated to the experiment groups (ten mice each) designed to assess the efficacy of β -lap against the different developmental stages of *S. mansoni*. Treatment was started on the 1st, 14th, 28th and 45th day after infection to evaluate the following stages of development: skin schistosomula, lung schistosomula, young worms (that is, before oviposition) and adult worms (that is, after oviposition), respectively. Treatment was continued for 5 consecutive days, intraperitoneally at a concentration of 50mg/kg/day. β -lap was resuspended in 10% dimethyl sulfoxide (DMSO), 1% Tween 80 and diluted in saline solution. Each experimental group treated with the β -lap was accompanied by a control group that received the drug vehicle only. All animals were euthanized by cervical dislocation 60 days after infection.

Parasitological parameters

Recovery of worms

The worms were recovered from the hepatic portal system and mesenteric vessels using the technique described by Smithers and Terry (1965). The percentage reduction in the number of worms after treatment was calculated as follows: % reduction = $C - V/C \times 100$. Where C = the mean number of parasites recovered from infected untreated animals and V = the mean number of parasites recovered from treated animals.

Oograma

Fragments from different sites in the small intestine were removed and used to evaluate the development and maturation of the *S. mansoni* eggs, as described by Pellegrino and colleagues (1962).

Ova count in hepatic tissue

To estimate the number of eggs per gram of hepatic tissue, a sample of the liver with about 0.3 g was removed from the central remaining part of the right lobe of each animal and processed separately using the potassium hydroxide (KOH) digestion technique (Cheever 1968).

Histopathological and morphometric study

For each perfused mouse, a sample of the liver was removed from the central part of the left lateral lobe and fixed in 10% buffered formaldehyde and embedded in paraffin blocks to obtain thin histological sections (5µm) that were stained with hematoxylin and eosin. Ten random fields per histological sample were used to count the average number of granulomas and these were evaluated histologically using natural light microscopy. Twenty granulomas of each animal containing a single central egg were randomly selected and used to determine the mean diameter of granulomas by measuring two perpendicular diameters transmiracidial the average level of the egg (Phillips et al. 1977). Images were obtained using an optical microscope

connected to a digital camera and a computer system (Motic Images Plus 2.0 MLTM). All evaluations were performed by double blind observers.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 3.02. Data were expressed as the mean $\pm$ SD. All variables were compared using Student's *t* test. In all cases, results were considered significant at $p < 0.05$.

Results

The effect of beta-lapachone on different developmental stages of S. mansoni

The administration of β -lap in mice harboring different stages of development of *S. mansoni* - skin schistosomule (1 day after infection), lung schistosomula (14 days after infection), young worms (28 days after infection) and adult worms (45 days after infection), significantly reduced ($p < 0.001$) the overall worm burden by 29.78%, 37.2%, 24.2% and 40.22% respectively, compared to the control. A similar percentage reduction was also achieved in the recovery of female worms for the same schemes of therapeutic intervention (Table 1). When analyzing the number of eggs per gram of hepatic tissue, β -lap induced significant reductions ($p < 0.001$) of 32.71%, 42.07%, 34.64% and 48.01% were achieved when the drug was administered on the 1st, 14th, 28th and 45th day after infection, respectively (Table 1).

Here table 1

In all groups, intestinal tissue samples exhibited *S. mansoni* eggs at all stages of development (data not shown). However, the treatment regimen using β -lap during the adult worms stage significantly reduced ($p < 0.001$) the percentage of immature eggs from 56.36% to 36.46% and significantly increased ($p < 0.001$) the percentage of mature eggs from 37.25% to 50.44 % and of dead eggs from 6.38% to 13.1% compared to the control (Figure 2).

Here figure 2

The effect of beta-lapachone on Schistosoma granulomas

There was a significant reduction ($p < 0.0001$) in the mean number of hepatic granulomas in all the groups treated with β -lap (Table 1). Histological analysis of hepatic tissue in all groups (treated with β -lap or not) exhibited liver capsule intact and typical granulomas with an exudative inflammatory reaction with immune system cells surrounding the eggs of *S. mansoni* in degeneration (Figures 3a, b and c). Only the group treated 45 days after infection showed a statistically significant ($p < 0.001$) reduction of 25.8% in the mean diameter of hepatic granuloma compared to the control (Figures 3c and 3d).

Here figure 3

Discussion

At present, praziquantel (PZQ) is the only drug responsible for reducing morbidity and mortality caused by *Schistosoma* (Lammie, Fenwick and Utzinger, 2006; King 2009). For this reason, the WHO has included schistosomiasis in the Special Program for Research and Training in Neglected Tropical Diseases, whose goal is to encourage research and the development of new drugs (Attallah et al., 2008; Abdul-Ghani et al., 2009; Mulvenna et al., 2010).

More than 100 million people are currently being treated with PZQ. The huge demand for its use is confirmed not only by the high prevalence, but by countless cases of reinfection which are portrayed in annual or semiannual basis (Hotez 2006). This leads to the development of resistant parasites and consequently to a collapse in treatment of the disease. It is thus prudent for research to focus on finding alternatives to PZQ.

The quinones constitute a broad-ranging and varied family of naturally-occurring metabolites. In terms of their molecular structure, quinones can be divided according to the type of aromatic system that sustains the quiononoidic ring: benzoquinones – a benzene ring; naphthoquinones – a naphthalene ring; anthraquinones – a linear or angular anthracene ring. β -lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b] pyran-5,6-dione, β -lap), is a lipophilic naphthoquinone, a semi-synthetic analog of lapachol found in *Tabebuia avellanedae* (popularly known as *Ipê roxo*), a plant of the Bignoneaceae family commonly found in many regions of Brazil. There is no doubt that lap- β exhibits *in vitro* and *in vivo* activity against various tumor

cell lines and inhibits conventional therapy-resistant tumors, particularly the proliferation of slow cell cycle neoplasms (Park et al., 2005; Suzuki et al., 2006; Moon et al., 2010).

Compounds with schistosomicidal activity can be effective in different ways: prophylactically (causing the death of schistosomula), suppressively (inhibiting oviposition) and curatively (causing the death of the adult worm) (Moraes et al., 2011). This is the first report of the anthelmintic effect of β -lap on the skin schistosomula, lung schistosomula, young worms and adult worms phases of *S. mansoni* in a murine model. For this evaluation we used the BH strain, which is native to Minas Gerais and predominates in endemic regions in Brazil (Zuim et al., 2012), a country with about six million people infected and another 25 million at permanent risk of contracting schistosomiasis (Lambertucci, 2010).

When a drug is used to suppress egg-laying, the oogram should demonstrate a higher percentage of mature eggs, as a result of previous ovipositions. This occurred in our study when mice harboring adult worms were treated with β -lap. In this group there was an exchange of percentages between immature and mature eggs, and a significant increase ($p < 0.001$) in dead eggs. In the other experimental groups, β -lap did not alter the oogram, since the intervention period occurred during the schistosomula and immature females stages (data not shown).

The reduction in the burden of eggs and granulomas in hepatic tissue induced by β -lap could be attributed to its schistosomicidal activity on female worms at different stages (Table 1). This effect results in a smaller number of granulomatous reactions and liver fibrosis in the course of infection. β -lap also significantly reduced the size of hepatic granulomas, when the intervention occurred concomitantly with full maturation of females, oviposition had already started and eggs had begun to accumulate in liver tissue. At this stage of infection, the granuloma is a delayed hypersensitivity reaction mediated by TCD_4^+ cells (Pearce and Macdonald, 2002). These cells trigger the Th1 response, with macrophage activation and subsequent synthesis of IL-2, IL-6, TNF- α and IFN- γ , nitric oxide (NO) and citrulline, determining the extent of inflammation (Modolell et al., 1995; Wynn and Cheever, 1995). In the present study, the reduction in the size of the granuloma can be attributed to the anti-inflammatory activity of β -lap, which inhibits the migration of neutrophils and reduces the synthesis of TNF- α , IL-6, NO and NO-sintetase (Liu et al., 1999, Tzeng et al., 2003, Sitônio et al., 2012). This, thus, seems to suggest that the β -lap module favors a granulomatous immune response and that therapeutic intervention for a longer period could result in early resolution of the granuloma. In addition,

the potential of the PZQ producing this therapeutic effect could be strengthened, since the experimental and clinical treatment of schistosomiasis PZQ is able to reduce the size of granulomas in a way that is apparently related to reduction of cell infiltrates (Zilton 2005; Aires et al., 2012).

β -lap is receiving huge interest for its powerful therapeutic properties against various diseases, including cancer, diabetes, obesity, and cardiovascular disease (Dong et al., 2009; Hwang et al., 2009; Kim et al., 2009). Moreover, β -lap has been shown *in vitro* and *in vivo* to have antimalarial properties against strains that are both sensitive and resistant to chloroquine (Andrade-Neto, 2004; Pérez-Sacau et al. 2005), and to be active against *Trypanosoma cruzi* (Menna-Barreto et al., 2007; Salas et al., 2008; Ferreira et al., 2011), fungi (Medeiros et al., 2010), both gram positive and gram negative bacteria (Coelho et al., 2010; Lourenço et al., 2011; Kenneth et al., 2012) and to inhibit the replication of the HIV-1 virus (Li et al., 1993).

It is suggested that these biological activities of β -lap derive from the inhibition of DNA topoisomerase activity or the impairment of DNA repair through reactive oxygen species (ROS) generation via NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1 (Krishnan and Bastow, 2000; Reinicke et al., 2005; Bey et al. 2007, Siew et al. 2012). However, information on the schistosomicidal activity mechanism is still not understood. Incidentally, it is well known that ROS generation can induce cytotoxicity and tissue injuries. The increase in ROS and H_2O_2 subsequently depletes the glutathione reserve by oxidizing reduced glutathione (GSH) to oxidized glutathione (GSSG), which could alter the activity of vital enzymes or proteins in *S. mansoni*, resulting in lipid peroxidation and protein disorganization and thereby affecting the parasites' ability to protect themselves from free radicals, resulting in their death (Azza et al. 2005, Kuntz et al. 2007, Seif el-Din et al. 2011). Therefore, the worms' antioxidant defense mechanisms may constitute a good target for chemotherapy (Azza et al. 2005).

However, the most obvious effect of host ROS on the schistosome is on the parasite surface (Mei et al. 1996). The schistosome tegument contains numerous mitochondria, which could be the main target of β -lap. β -lap affects the mitochondrial functioning by redox cycling-mediated oxidation (Witte, Stoppani and Dubin 2004), inducing internucleosomal fragmentation of DNA, release of cytochrome c, and activation of caspase-3 (Li et al., 1999, Li et al., 1999; Menna-Barreto et al., 2007; Salas et al., 2008). Recently, Lorsuwannarat and colleagues (2013) have suggested the 5-hydroxy-2-methyl-1,4-naphthoquinone, known as plumbagin, action route

for these mechanisms against adult *S. mansoni* worms. According to Zhai and colleagues (2002) mature adult worms have a higher anti-oxygen free-radical effect and other biochemical kinds of toxicity than the juvenile worms, leading to a higher mortality rate in juvenile worms than in the mature adult worms of *S. mansoni*. However, β -lap acted similarly in all the stages of development evaluated here.

In contrast to PZQ, which causes an increase in the permeability of the membranes of schistosome cells leading to calcium-producing sustained muscular contraction, spastic paralysis and tegument damage (Doenhoff *et al.*, 2008 & 2009), β -lap, in tumor cells and in the ileum, promotes efflux this ion, suggesting that the increase in plasma Ca^{2+} is responsible for its apoptotic effect (Tagliarino *et al.*, 2001; Bentle *et al.*, 2006). This antagonistic effect is, therefore, an important target for future β -lap research regarding the calcium channels of *S. mansoni*.

Naphthoquinones, including β -lap, have been shown to be active against other phases in the development of *S. mansoni*. Pinto and colleagues (1997) evaluated naphthoquinone derivatives that might topically inhibit the penetration of *S. mansoni* cercariae. Of the derivatives studied, 15 naphthoquinone blocked penetration by cercariae when applied to the tails of mice 24 hours prior to infection through the tail. In the group exposed to β -lap, blocking was 100%. In the present study administration of β -lap 24 hours after exposure to cercariae reduced the worm burden. Studies conclude that topical formulations that block cercarial penetration may be used as prophylactic drugs in endemic regions (Pinto *et al* 1997;. Wulff, Haerberlein e Hass 2007; Kasny *et al* 2007, Haas *et al.* 2008). Furthermore, naphthoquinone derivatives are also active against the intermediate host of *S. mansoni*. These compounds kill adult snails and the spawn of *B. glabrata* (Lima *et al*, 2002a; Lima *et al*, 2002b; Ribeiro *et al.* 2009).

In view of the limited aqueous solubility of β -lap (Lindenberg *et al.*, 2004), formulations have been developed to ensure greater bioavailability and biological activity, the use of lower doses and a convenient administration route, as well as to control minor side effects. β -lap complexed in cyclodextrin shows promising signs in anti-tumor clinical studies in phase I, II and III (Li *et al.*, 2006; Khong *et al*, 2007, Yang *et al.* 2008). In view of the moderate activity of β -lap against *S. mansoni*, the use of new formulations provides the prospect of studies aiming to increase activity and shed light on the action mechanism, and to use this drug as a prototype for the synthesis of new naphthoquinone derivatives with potential schistosomicidal properties.

Acknowledgments This work received financial support for Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq - Brasil, Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (FACEPE) and Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

References

- Abdul-Ghani, R.A., Loutfy, N., Hassan, A., 2009. Experimentally promising antischistosomal drugs: a review of some drug candidates not reaching the clinical use. *Parasitol. Res.* 105, 899-906.
- Aires, A.L., Albuquerque, M.C.P.A., Silva, R.A.R., Schirato, G.V., Filho, N.T.P., Araújo, S.B., Souza, V.M.O., Costa, V.M.A., Malagueño, E. 2012. Immunohistopathological changes in murine Schistosomiasis mansoni under the influence of N-acetyl-L-cysteine. *Parasitol. Res.* 4, 1569-1578.
- Andrade-Neto, V.F., Goulart, M.O.F., Silva-Filho, J.F., Silva, M.J., Pinto, M.C.F.R., Pinto, A.V., Zalis, M.G., Carvalho, L.H., Krettli, A.U., 2004. Antimalarial activity of phenazines from lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium berghei* *in vivo*. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14, 1145–1149.
- Attallah, A.M., Wahba, M.A., Elsheikha, H.M., Abbas, A.T., Abdel A.M.M., El-hemaly, M.A., 2008. Outcomes of *Schistosoma mansoni* infection in outbred albino mice exposed to Larvin contaminant. *Parasitol. Res.* 103, 567–576.
- Azza, M.M., Nadia, M.M., Sohair, S.M., 2005. *Sativa* seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100, 205-211.
- Bentle, M.S., Reinicke, K.E., Bey, E.A., Spitz, D.R., Boothman, D.A., 2006. Calcium-dependent modulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 alters cellular metabolism and DNA repair. *J. Biol. Chem.* 281, 33684-33696.
- Bey, E.A., Bentle, M.S., Reinicke, K.E., Dong, Y., Yang, C.R., Girard, L., Minna, J.D., Bornmann, W.G., Gao, J., Boothman, D.A., 2007. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by beta-lapachone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 28, 11832-11837.
- Cavalcante, F.A., Silva, J.L.V., Carvalho, V.M.N., Camara, C.A., Silva, T.M., Pinto, A.C., et al. 2008. Spasmolytic activity of lapachol and its derivatives, alpha and beta-lapachone, on the guinea-pig ileum involves blockade of voltage-gated calcium channels. *Rev. Bras. Farmacog.* 18, 183–189.
- Cheever, A.W., 1968. Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansoni* eggs in tissues. *Bull. World. Health. Organ.* 39, 328–331.
- Cioli, D., Botros, S.S., Wheatcroft-Francklow, K., Mbaye, A., Southgate, V., Tchuenté, L.A., Pica-Mattoccia, L., Troiani, A.R., El-Din, S.H., Sabra, A.N., Albin, J., Engels, D., Doenhoff, M.J., 2004. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *Int. J. Parasitol.* 34, 979–987.

- Cioli, D., Valle, C., Angelucci, F., Miele, A.E., 2008. Will new antischistosomal drugs finally emerge? *Trends. Parasitol.* 24, 379–382.
- Coelho, T.S., Silva, R.S., Pinto, A.V., Pinto, M.C., Scaini, C.J., Moura, K.C., Almeida, S.P., 2010. Activity of β -lapachone derivatives against rifampicin-susceptible and -resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*. 90, 293-297.
- Doenhoff, M.J., Cioli, D., Utzinger, J., 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 659-67.
- Doenhoff, M.J., Hagan, P., Cioli, D., Southgate, V., Pica-Mattoccia, L., Botros, S., Coles, G., Tchuem, T.L.A., Mbaye, A., Engels, D., 2009. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology* 136, 1825-1835.
- Dong, Y., Chin, S.F., Blanco, E., Bey, E.A., Kabbani, W., Xie, X.J., Bornmann, W.G., Boothman, D.A., Gao, J., 2009. Intratumoral delivery of beta-lapachone via polymer implants for prostate cancer therapy. *Clin. Cancer. Res.* 15, 131-139.
- Ferreira, S.B., Salomão, K., Silva, F.C., Pinto, A.V., Kaiser, C.R., Pinto, A.C., Ferreira, V.F., Castro, S.I., 2011. Synthesis and anti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone analogues. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 3071–3077.
- Haas, W., Haeberlein, S., Behring, S., Schönambsgruber, E., Zopelli, E., 2008. *Schistosoma mansoni*: human skin ceramides are a chemical cue for host recognition of cercariae. *Exp. Parasitol.* 120, 94-97
- Hotez, P.J., Molyneux, D.H., Fenwick, A., Ottesen, E., Ehrlich, S.S., et al. 2006. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. *PLoS. Med.* 3, 576 – 584.
- Hwang, J.H., Kim, D.W., Jo, E.J., Kim, Y.K., Jo, Y.S., Park, J.H., Yoo, S.K., Park, M.K., Kwak, T.H., Kho, Y.L., et al. 2009. Pharmacological stimulation of NADH oxidation ameliorates obesity and related phenotypes in mice. *Diabetes* 58, 965–974.
- Kasny, M., Mikes, L., Dalton, J.P., Mountford, A.P., Horak, P., 2007. Comparison of cysteine peptidase activities in *Trichobilharzia regenti* and *Schistosoma mansoni* cercariae. *Parasitology* 134, 1599–1609.
- Kenneth, O.E., Senthil, P.K., Victor, K., Gabriel, N.F., Henrietta, L., Marion, J.J.M., Namrita, L., Sundarababu, B., 2012. Cobalt mediated ring contraction reaction of lapachol and initial antibacterial evaluation of naphthoquinones derived from lapachol. *Med. Chem. Res.* 21, 2117–2122.
- Khong, H.T., Dreisbach L., Kindler, H.L., Trent, D.F., Jeziorski, K.G., Bonderenko, I., et al., 2007. A phase 2 study of ARQ 501 in combination with gemcitabine in adult patients with treatment naïve, unresectable pancreatic adenocarcinoma. *Proceedings ASCO Annual Meeting, Chicago, USA.* 1-5, 15017.
- Kim, S.Y., Jeoung, N.H., Oh, C.J., Choi, Y.K., Lee, H.J., Kim, H.J., Kim, J.Y., Hwang, J.H., Tadi, S., Yim, Y.H., et al. 2009. Activation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 prevents arterial restenosis by suppressing vascular smooth muscle cell proliferation. *Circ. Res.* 104, 842– 850.

- King, C.H., 2009. Toward the elimination of *schistosomiasis*. N. Engl. J. Med. 360, 106-109.
- Krishnan, P., Bastow, K.B., 2000. Novel mechanisms of DNA topoisomerase II inhibition by Pyranonaphthoquinone derivatives – Eleutherin, α lapachone and β lapachone. Biochemical Pharmacology 60, 1367-1379.
- Kuntz, A.N., Davioud-Charvet, E., Sayed, A.A., Califf, L.L., Dessolin, J., et al. 2007. Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: An Essential Parasite Enzyme and a Key Drug Target. PLoS. Med. 4, 1071- 1086.
- Lambertucci, J.R., 2010. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. Memórias Instituto Oswaldo Cruz 105, 422-435.
- Lammie, P.J., Fenwick, A., Utzinger, J., 2006. A blueprint for success: integration of neglected tropical disease control programmes. Trends. Parasitol. 22, 313–321.
- Li, C., Nemunaitis, J., Senzer, N., Edelman, G., Glasner, S., Dombal, G., Douvholuk, A., Cunningham, C., 2006. A phase Ib trial of ARQ 501, a selective checkpoint activator, in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumors. J. Clin. Oncol. 24, 13053.
- Li, C.J., Li, Y.Z., Pinto, A.V., Pardee, A.B., 1999. Potent inhibition of tumor survival in vivo by β -lapachone plus taxol: Combining drugs imposes different artificial checkpoints. PNAS 96, 13369–13374.
- Li, C.J., Zhang, L.J., Dezube, B.J., Crumpacker, C.S., Pardee, A.B., 1993. Three inhibitors of type 1 human immunodeficiency virus long terminal repeat-directed gene expression and virus replication. Medical Sci. 90, 1839-1842.
- Li, Y.Z., Li, C.J., Pinto, A.V., Pardee, A.B., 1999. Release of mitochondrial cytochrome C in both apoptosis and necrosis induced by β -lapachone in human carcinoma cells. Molecular Medicine 5, 232-239.
- Lima, N.M.F., Correia, C.S., Ferraz, P.A.L., Pinto, A.V., Pinto, M.C.R.F., Sant’Ana, A.E.G., Goulart, M.O.F., 2002b. Molluscicidal hydroxynaphthoquinones and derivatives. Correlation between their redox potentials and activity against *Biomphalaria glabrata*. J. Braz. Chem. Soc. 13, 822-829.
- Lima, N.M.F., Santos, A.F., Porfírio, Z., Goulart, M.O.F., Santana, A.E.G. 2002a. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotic*. Acta Tropica 83, 43-47.
- Lindenberg, M., Koop, S., Dressman, J.B., 2004. Classification of orally administered drugs on the World Health Organization Model list of Essential Medicines according to the biopharmaceutics classification system. Eur. J. Pharm. Biopharm. 58, 265-278.
- Liu, S.H., Tzeng, H.P., Kuo, M.L., Lin-Shiau, S.Y., 1999. Inhibition of inducible nitric oxide synthase by β -lapachone in rat alveolar macrophages and aorta. Br. J. Pharmacol. 126, 746-750.
- Lorsuwannarat, N., Saowakon, N., Ramasoota, P., Wanichanon, C., Sobhon, P., 2013. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. Exp. Parasitol. 133, 18-27.
- Lourenço, A.L., Abreu, P.A., Leal, B., Silva, J.E.N., Pinto, A.V., Pinto, M.C., Souza, A.M., Novais, J.S., Paiva, M.B., Cabral, L.M., Rodrigues, C.R., Ferreira, V.F., Castro, H.C., 2011. Identification of nor- β -lapachone derivatives as potential antibacterial compounds against *Enterococcus faecalis* clinical strain. Curr. Microbiol. 62, 684-689.

- Medeiros, C.S., Pontes-Filho, N.T., Camara, C.A., Lima-Filho, J.V., Oliveira, P.C., Lemos, A.S., Leal, A.F.G., Brandão, J.O.C., Neves, R.P., 2010. Antifungal activity of the naphthoquinone beta-lapachone against disseminated infection with *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* in dexamethasone-immunosuppressed Swiss mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 43, 345-349.
- Mei, H., Thakur, A., Schwartz, J., LoVerde, P.T., 1996. Expression and characterization of glutathione peroxidase activity in the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Infect. Immun.* 64, 4299-4306.
- Menna-Barreto, R.F.S., Corrêa, J.R., Pinto, A.V., Soares, M.J., Castro, S.L., 2007. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from β -lapachone. *Parasitol. Res.* 101, 895-905.
- Miao, X.S., Zhong, C., Wang, Y., Savage, R.E., Yang, R.Y., Kizer, D., Volckova, E., Ashwell, M.A., Chan, T.C., 2009. *In vitro* metabolism of beta-lapachone (ARQ 501) in mammalian hepatocytes and cultured human cells. *Rapid. Commun. Mass. Spectrom.* 23, 12-22.
- Modolell, M., Corraliza, I.M., Link, F., Soler, G., Eichmann, K., 1995. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone-marrow-derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur. J. Immunol.* 25, 1101-1104.
- Moon, D.O., Kang, C.H., Kim, M.O., Jeon, Y.J., Lee, J.D., Choi, Y.H., Kim, G.Y., 2010. β -Lapachone (LAPA) decreases cell viability and telomerase activity in leukemia cells: suppression of telomerase activity by LAPA. *J. Med. Food.* 13, 481-488.
- Moraes, J., Nascimento, C., Lopes, P.O., Nakano, E., Yamaguchi, L.F., Kato, M.J., Kawano, T., 2011. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. *Exp. Parasitol.* 127, 357-364.
- Mulvenna, J., Moertel, L., Jones, M.K., Nawaratna, S., Lovas, E.M., Gobert, G.N., Colgrave, M., Jones, A., Loukas, A., Mcmanus, D.P., 2010. Exposed proteins of the *Schistosoma japonicum* tegument. *Int. J. Parasitol.*, 40, 543-554.
- Neghina, R., Neghina, A.M., Merkle, C., Marincu, I., Moldovan, R., Iacobiciu, I., 2009. Intestinal schistosomiasis, importation of a neglected tropical disease in Romania: case report of a traveler to endemic regions. *Travel Med. Infect. Dis.* 7, 49-51.
- Olivier, L., Stirewalt, M.A., 1952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *S.mansoni*. *J. of Parasitology* 38, 19-23.
- Park, H.J., Ahn, K.J., Ahn, S.D., Choi, E., Lee, S.W., et al., 2005. Susceptibility of cancer cells to β -lapachone is enhanced by ionizing radiation. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 61, 212-219.
- Pearce, .EJ., Macdonald, A.S., 2002. The immunobiology of Schistosomiasis. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 499-511.
- Pellegrino, J., Oliveira, C.A., Faria, J., Cunah, A.S., 1962. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 11, 201-215.
- Pérez-sacau, E., Estévez-braun, A., Ravelo, A.G., Gutiérrez, Y.D., Giménez, T.A., 2005. Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapachol and beta-lapachone. *Chem. Biodivers.* 2, 264-74.

- Phillips, S.M., DiConza, J.J., Gold, J.A., Reid, W.A., 1977. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse. I. Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation, and host morbidity. *J. Immunol.* 118, 594-599.
- Pinto, A.V., Pinto, M.C.R., Gilbert, B., Pellegrino, J., Mello, R.T., 1997. *Schistosoma mansoni* blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: I. Naphthoquinones and derivatives. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 71, 133-135.
- Reinicke, K.E., Bey, E.A., Bentle, M.S., Pink, J.J., Ingalls, S.T., Hoppel, C.L., Misico, R.I., Arzac, G.M., Burton, G., Bornmann, W.G., et al., 2005. Development of beta-lapachone prodrugs for therapy against human cancer cells with elevated NAD(P)H:quinine oxidoreductase 1 levels. *Clin. Cancer. Res.* 11, 3055-3064.
- Ribeiro, K.A.L., Carvalho, C.M., Molina, M.T., Lima, E.P., Lópezmontero, E., Reys, J.R.M., Oliveira, M.B.F., Pinto, A.V., Sant'ana, A.E.G., Goulart, M.O.F., 2009. Activities of naphthoquinones against *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae), vector of dengue and *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), intermediate host of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica.* 111, 44-50.
- Rich, T., Allen, R.L., Wyllie, A.H., 2000. Defying death after DNA damage. *Nature.* 407, 777-83.
- Salas C, Tapia RA, Ciudad K, Armstrong V, Orellana M, Kemmerling U, Ferreira J, Maya JD, Morello A (2008) *Trypanosoma cruzi*: activities of lapachol and alpha and beta-lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. *Bioorg Med. Chem.* 16, 668-674.
- Schuerch, A.R., Wehrli, W., 1978. β -Lapachone, an Inhibitor of Oncornavirus Reverse Transcriptase and Eukaryotic DNA Polymerase- α . *Eur. J. Biochem.* 84, 197-205.
- Seif el-Din, S.H., Al-Hroob, A.M., Ebeid, F.A., 2011. *Schistosoma mansoni*: N-acetylcysteine downregulates oxidative stress and enhances the antischistosomal activity of artemether in mice. *Experimental Parasitology* 128, 230-235.
- Siew, E.L., Chan, K.M., Williams, G.T., Ross, D., Inayat-Hussain, S.H., 2012. Protection of hydroquinone-induced apoptosis by downregulation of FAU is mediated by NQO1. *Free Radic. Biol. Med.* 8, 1616-1624.
- Sitônio, M.M., Júnior, C.H.R.C., Campos, I.A., Silva, J.B.N.F., Lima, M.C.A., Góes, A.J.S., Maia, M.B.S., Rolim, P.J.N., Silva, T.G., 2012. Anti-inflammatory and anti-arthritic activities of 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione (b-lapachone). *Inflamm. Res.* 62, 107-113.
- Smithers, S.R., Terry, R.J., 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of adult worms. *Parasitology* 55, 695-700.
- Steinmann, P., Keiser, J., Bos, R., Tanner, M., Utzinger, J., 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect. Dis.* 6, 411-425.
- Suzuki, M., Amano, M., Choi, J., Park, H.J., Williams, B.W., Ono, K., Song, C.W., 2006. Synergistic effects of radiation and beta-lapachone in DU-145 human prostate cancer cells *in vitro*. *Radiat. Res.* 165, 525-531.

- Tagliarino, C., Pink, J.J., Dubyak, G.R., Nieminen, A.L., Boothman, D.A., 2001. Calcium is a key molecule in β -lapachone-mediated cell death. *J. Bio. Chem.* 276, 19150-19159.
- Tzeng, H.P., Ho, F.M., Chao, K.F., Kuo, M.L., Lin-Shiau, S.Y., Liu, S.H., 2003. Beta-Lapachone reduces endotoxin-induced macrophage activation and lung edema and mortality. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 168, 85-91.
- Utzinger, J., Keiser, J., Shuhua, X., Tanner, M., Singer, B.H., 2003. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 47, 1487-1495.
- Wang, W., Dai, J.R., Li, H.J., Shen, X.H., Liang, Y.S., 2010. Is there reduced susceptibility to praziquantel in *Schistosoma japonicum*? Evidence From China. *Parasitology*. 137, 1905-1912.
- Witte, N.V., Stoppani, A.O., Dubin, M., 2004. 2-Phenyl-beta-lapachone can affect mitochondrial function by redox cycling mediated oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 15, 129-35.
- World Health Organization on behalf of the Special Program for Research and Training in Tropical Diseases. 2008. The Social Context of Schistosomiasis and its Control: An Introduction and Annotated Bibliography. Birgitte Bruun, Jens Aagaard-Hansen. Geneva.
- Wulff, C., Haeberlein, S., Haas, W., 2007. Cream formulations protecting against cercarial dermatitis by *Trichobilharzia*. *Parasitol. Res.* 101, 91-97.
- Wynn, T.A., Cheever, A.W., 1995. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. *Current Opinion in Immunology*, Philadelphia, 7, 505-511.
- Yang, R.Y., Kizer, D.K., Wu, H., Volckova, A.E., Miao, X.S., Ali, S.M., 2008. Synthetic methods for the preparation of ARQ 501 (β -Lapachone) humsn blood metabolites. *Bioorg. Med. Chem.* 16, 5635-5643.
- Zhai, Z.L., Jiao, P.Y., Mei, J.Y., Xiao, S.H., 2002. Glutathione inhibits the antischistosomal activity of artemether. *Chin. J. Parasitol. Parasit. Dis.* 20, 212-215.
- Zilton, A.A., 2005. Regressão da fibrose hepática. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 38, 514-520.
- Zuim, N.R.B., Allegretti, S.M., Linhares, A.X., Magalhães, L.A., Zanotti-Magalhães, E.M., 2012. A Study of the Granulomatous Responses Induced by Different Strains of *Schistosoma mansoni*. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*. 2012, 1-8. doi:10.1155/2012/953524.

CAPTIONS

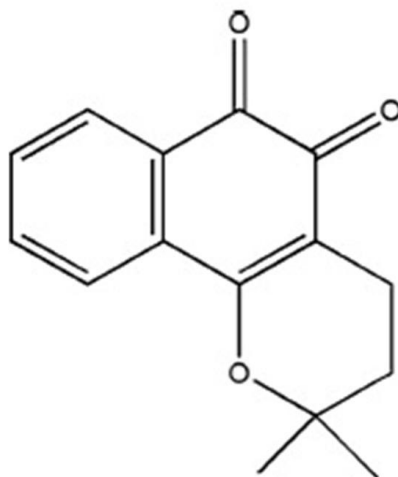


Fig. 1 Chemical structures of β -lapachone

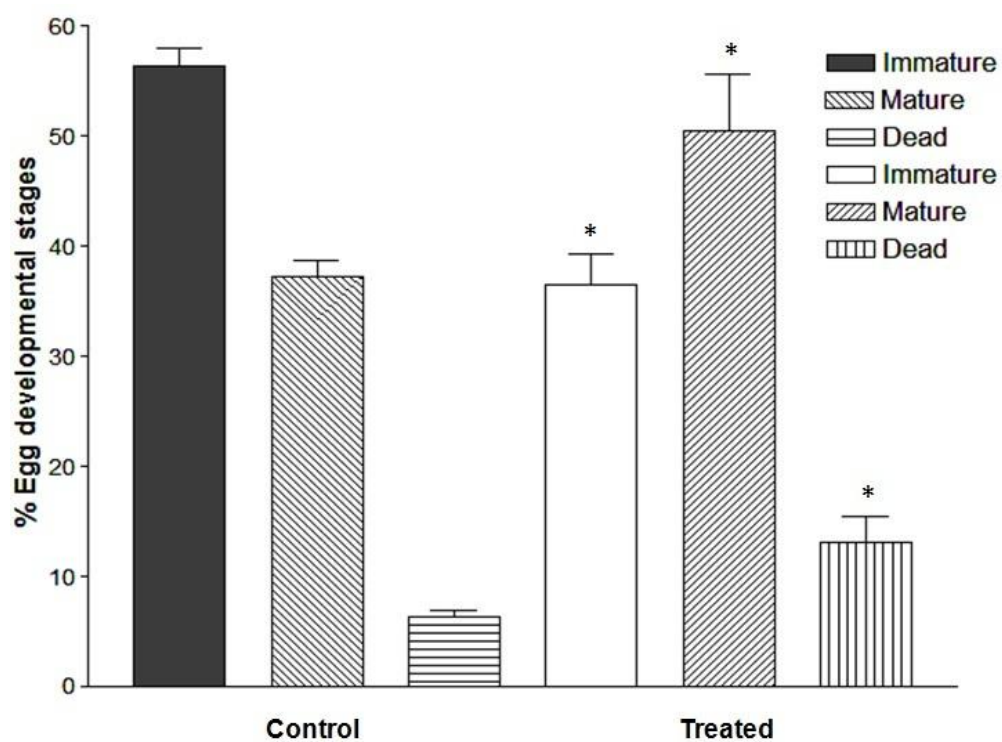


Fig. 2 *In vivo* effect of Beta lapachone in oviposition pattern of adult worms of *Schistosoma mansoni*

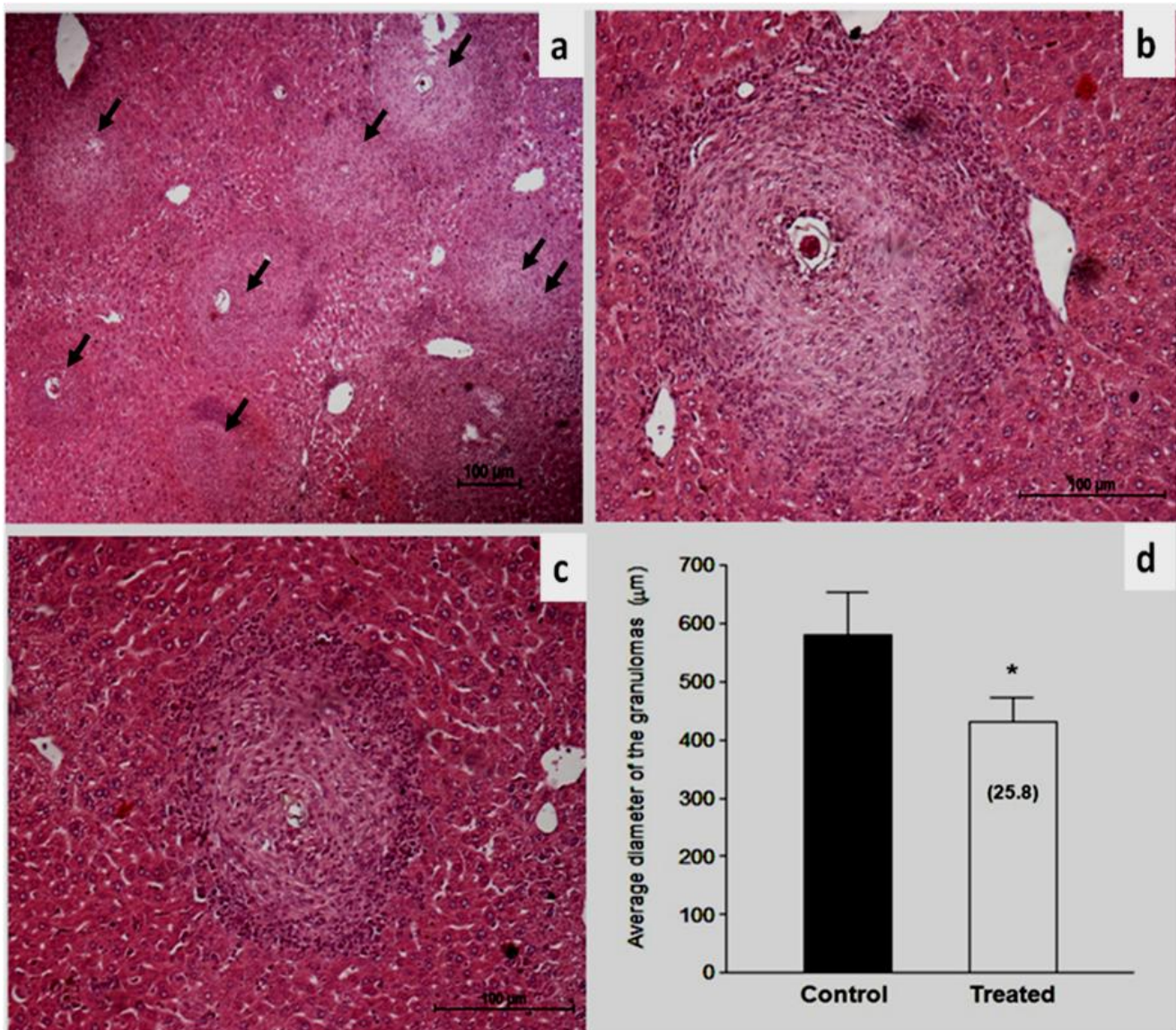


Fig. 3 Histological sections of periovular hepatic granuloma in mice infected with *S. mansoni*. (a, 40x) and (b, 100x) Granulomas in animals not exposed to treatment with β -lap (controls) showing intense infiltration of eosinophils and polymorphonuclear neutrophils, in addition to a few macrophages and lymphocytes surrounding the egg central degeneration. (c, 100x) The granuloma of animals treated with β -lap when harboring adult worms (45th day post infection) surrounded by fibrous collagen bundles entangling fibroblasts and a few inflammatory cells. (d) Average diameter of granuloma of animals treated with β -lap when harboring adult worms (45 days post infection).

Table 1 Effects of beta-lapachone treatment (50mg/kg/day for 5 consecutive days) on worm burdens, eggs and average number of the granulomas in liver tissue in mice harboring different developmental stages of *S. mansoni*, perfused 60 days after infection.

Administration: days post- infection/develop ment phase	Groups	Mean worm burden			Number of Ova/g tissue			Granuloma schistosomic	
		Total	Reductions (%)	female	Reduction (%)	Liver $\times 10^3$	Reduction (%)	Average number	Reduction (%)
1° day/skin schistosomula	Treated	15,63 $\pm$ 2,56*	29.78	7,37 $\pm$ 1,18**	24.09	8.29 $\pm$ 1.23*	32.71	8.87 $\pm$ 1.88	49.6
	Control	22,29 $\pm$ 2,29	-	9,71 $\pm$ 1,11	-	12.32 $\pm$ 2.42	-	17,6 $\pm$ 3,05	-
14°/lung schistosomula	Treated	14,57 $\pm$ 1,62*	37.2	6,85 $\pm$ 0,89*	37.7	7.31 $\pm$ 1.19*	42.07	9,85 $\pm$ 2,11	51.7
	Control	23,2 $\pm$ 2,38	-	11,0 $\pm$ 1,0	-	12.62 $\pm$ 1.67	-	20,40 $\pm$ 2,40	-
28°/young worms	Treated	18,17 $\pm$ 2,32*	24.7	8,66 $\pm$ 1,21*	22.26	9.62 $\pm$ 1.27*	34.64	12,0 $\pm$ 1,63	39.39
	Control	24.14 $\pm$ 2,54	-	11,14 $\pm$ 1,21	-	14.72 $\pm$ 1.62	-	19,8 $\pm$ 1,92	-
45°/adult worms	Treated	13.0 $\pm$ 2.44*	40.22	6,0 $\pm$ 1,15*	39.2	6.81 $\pm$ 0.86*	48.01	19,4 $\pm$ 2,4	58.76
	Control	21.75 $\pm$ 3.95	-	9,87 $\pm$ 1,45	-	13.1 $\pm$ 2.21	-	8,0 $\pm$ 1,41	-

Values are expressed as mean of 10 mice $\pm$ SD

Groups were tested against their respective control using Student's t test.

* p<0.001

**p<0.01

Experimental Parasitology: Submission Confirmation

EP (ELS) <ep@elsevier.com>
Para: jcmonica@globo.com

1 de fevereiro de 2013 18:12

Title: β -Lapachone (3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol [1,2-b] pyran-5,6-dione) against different stages of the *Schistosoma mansoni* in mice

Corresponding Author: Dr Monica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

Authors: André L Aires, Doctor; Eulália Camelo P Azevedo Ximenes, Doctor; Vanessa X Barbosa, Master; Alexandre José S Góes, Doctor; Valdênia Maria O Souza, Doctor;

Dear Dr Pessoa de Azevedo Albuquerque,

This is to confirm that the above-mentioned manuscript has been received for consideration in Experimental Parasitology.

You will be able to check on the progress of your manuscript by logging on to the Elsevier Editorial System for Experimental Parasitology as an author:

<http://ees.elsevier.com/ep/>

Your username is: MPessoa de Azevedo-428

If you cannot remember your password, please click the "Send Username/Password" link on the login page.

Your paper will be given a manuscript number shortly and you will soon receive an e-mail with this number for your reference.

Thank you for submitting your manuscript to Experimental Parasitology. Should you have any questions, please feel free to contact our office.

Kind regards,

Elsevier Editorial System
Experimental Parasitology

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>

Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados, podemos concluir que:

- β -lap nas concentrações de 50 μ M e 100 μ M apresenta atividade esquistosomicida *in vitro* sobre vermes adultos machos de *S. mansoni* causando alteração na motilidade e danos ao tegumento que levaram a morte do parasito.
- β -lap apresenta atividade esquistossomicida sobre esquistossômulos de pele, esquistossômulos pulmonar, vermes jovens e vermes adultos de *S. mansoni*, reduzindo a carga de vermes totais e de vermes fêmeas, o número de ovos e granulomas no tecido hepático em modelo murino.
- β -lap reduziu o tamanho de granuloma hepático e modificou o padrão de oviposição em camundongos albergando vermes adultos de *S. mansoni*.

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Recife, 26 de maio de 2010.

Ofício nº 275/2010

Da Comissão de Ética no uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: **Profª. Monica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque**
Departamento de Medicina Tropical – UFPE
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076. 020127/2010-47

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, **"Avaliação da Atividade Esquitossomicida da β -Lapachona"**

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos parecer favorável aos protocolos experimentais a serem realizados.

Observação:

Origem dos animais: Biotério do Laboratório de Imunologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE; Animais: Camundongos, Linhagem: Swiss webster, Sexo: Fêmeas; Idade: 4 (quatro) semanas. Número de animais previsto no projeto: 112 (Cento e doze) para teste in vivo e 30 (trinta) para teste in vitro.

Atenciosamente,


Profª. Maria Teresa Jansen
Presidente da CEEA

CCB: Integrar para desenvolver