



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
MESTRADO EM BIOQUÍMICA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA α -D-GLUCANA SULFATADA DO LÍQUEN
Ramalina celastri LIVRE E ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS FRENTE À
INFECCÃO EXPERIMENTAL POR *Schistosoma mansoni***

ROSANGELA VIDAL DE SOUZA ARAÚJO

Orientadora:

Prof^ª. Dr^ª. Nereide Stela Santos Magalhães

Orientadora Externa:

Prof^ª. Dr^ª. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão

Recife
2004

ROSANGELA VIDAL DE SOUZA ARAÚJO

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA α -D-GLUCANA SULFATADA DO LÍQUEN
Ramalina celastri LIVRE E ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS FRENTE À
INFECCÃO EXPERIMENTAL POR *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das exigências para
obtenção do título de Mestre em
Bioquímica pela Universidade Federal de
Pernambuco

Aprovado por:

Profa. Dra. Nereide Stela Santos Magalhães (Presidente)

Profa. Dra. Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão (Orientadora Externa)

Prof. Dr. Luís Bezerra de Carvalho Júnior

Profa. Dra. Maria das Graça C. Cunha

Prof. Dr. Eryvaldo Sócrates Tabosa do Egito

Data: 19 de Fevereiro de 2004

SUMÁRIO

	Pág.
AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE TABELAS	v
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vi
RESUMO	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA	1
1.2 LIPOSSOMAS	7
1.3 MODIFICADORES DE RESPOSTA BIOLÓGICA: POLISSACARÍDEOS BIOLOGICAMENTE ATIVOS	10
1.4 POLISSACARÍDEOS DE <i>Ramalina celastri</i> (<i>R. celastri</i>)	12
1.5 HISTOQUÍMICA COM LECTINAS	15
2. OBJETIVOS	16
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
ARTIGO	23

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado vida, saúde e oportunidade de ter realizado este trabalho.

Aos meus familiares, Painho, Mainha, Hugo e Nanda, por me acompanharem diariamente, preocupando-se com cada momento de realização deste trabalho.

Ao Breno, por me ajudar sempre que precisava, sempre com suas inteligentes opiniões, e por sua dedicação a mim.

À Prof^a Dr^a e amiga Ana Maria dos Anjos Carneiro Leão, pelos cinco anos de amizade que me fortalece muito e por me orientar tão corretamente.

À Prof^a Dr^a Nereide Stela Santos Magalhães, a qual apesar de apenas dois anos de convivência, considero uma amiga, de quem aprendi a admirar sua dedicação à ciência, obrigada por ter confiado em mim.

Ao Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Júnior, responsável pelo setor de bioquímica do LIKA, que sempre amigo e feliz, nos passa o verdadeiro conhecimento.

Ao Mestrado em Bioquímica e aos seus professores, por terem me ensinado conhecimentos de grande utilidade.

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica, excelentes profissionais e, em especial, a Miron que é uma pessoa maravilhosa e amiga.

Aos meus amigos de turma do mestrado: Catarina, João, Nerivan, Ana Acácia, LÍlian, Micheli, Neila, Regina e Alexandre, pessoas que conviveram comigo e que dividiram momentos de felicidade.

Aos colegas do setor de bioquímica do LIKA, Lú Mata, Yan, Bruno, Givanildo e Lú, Hercília, Mariane, Paulo, Ruben, Henrique, João Paulo, Milena, Simone, Dayse, Lúcio,

Marcela, Ana Catarina, Rose e Noêmia, a todos vocês, o meu agradecimento por tudo, trabalho, amizade e momentos maravilhosos, o que, se Deus quiser, irão continuar.

Aos colegas do setor de Patologia do LIKA Jorge, David, Marcos, Yuri, Renata, Synara, pelos momentos de descontração que são importantíssimos, em especial ao Mário, pelas ajudas constantes e opiniões valiosíssimas.

Aos funcionários do LIKA, meu sincero agradecimento, em especial a Luís Filipe (bioterista) e Carmelita Bezerra, por terem me ensinado tantas coisas, que, sem as quais, esse trabalho poderia ter sido realizado com maiores dificuldade.

Ao Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho (diretor) e Profa. Dra. Maria Elizabeth Chaves (coordenadora de administração) do LIKA, pelo acesso aos laboratórios.

Ao Departamento de Bioquímica da UFPR, na pessoa no Prof. Dr. Marcelo Iacomini, por sua confiança em nosso trabalho, aceitando nossas colaborações.

À Ana Catarina Simonetti, pelo companheirismo e verdadeira amizade em todos os momentos espero que nossa amizade seja eterna.

Aos meus estagiários Henrique e Cristiane, por confiarem em mim, que, pois apesar de ocupada, sempre lembro de vocês e espero que nosso trabalho renda bons frutos.

Ao programa PIBIC/UFRPE, na pessoa da Profa. Dra. Ana Lúcia Porto, pela sua ajuda na minha formação científica e acadêmica e pelas duas atuais bolsista do programa Cristiane e Fernanda, as quais, colaboro com suas orientações.

Ao CNPq e à REDE NANOBIOTEC, pelo suporte financeiro.

À todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE FIGURAS (Introdução)

	Pág.
1	Ciclo evolutivo do <i>Schistosoma mansoni</i> 2
2	Estrutura de lipossomas unilamelares 7
3	Líquen <i>R. celandri</i> 12
4	Estrutura do polissacarídeo extraído de <i>R. celandri</i> 14

LISTA DE FIGURAS (Artigo)

	Pág.
1	Acompanhamento do pH da suspensão lipossomal contendo α -glucana-SO ₄ (F4), estocada a 4°C. 32
2	Efeito dos tratamentos com a α -glucana-SO ₄ livre e encapsulada em lipossomas sobre o número médio de ovos excretados nas fezes dos animais infectados por <i>S. mansoni</i> . 33
3	Efeito dos tratamentos com a α -glucana-SO ₄ livre e encapsulada em lipossomas sobre o número médio de granulomas hepáticos (A) e intestinais (B). 35
4	Padrão de marcação de Con A sobre o sistema ovo-granuloma hepático no grupo tratado com a α -glucana-SO ₄ (A) e NaCl 150 mM. 400× 37
5	Padrão de marcação de Con A sobre o sistema ovo-granuloma hepático no grupo tratado com a α -glucana-SO ₄ encapsulada (A) e grupo lipossomas vazios. 400× 38

LISTA DE TABELAS

	Pág.
1 Formulações Lipossomais	28
2 Avaliação de formulações contendo α -glucana-SO ₄ nos testes de estabilidade acelerada e a longo-prazo.	32
3 Efeito dos tratamentos com a α -glucana-SO ₄ livre e encapsulada em lipossomas sobre o número médio de vermes recuperados do sistema porta-hepático-mesentérico dos animais infectados por <i>S. mansoni</i> .	34
4 Padrão de reatividade de sistemas ovo-granuloma hepáticos e intestinais em camundongos tratados com α -glucana-SO ₄ livre e encapsulada em lipossomas.	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

O_x: Oxamniquina

P_z: Praziquantel

S. mansoni: *Schistosoma mansoni*

MLV: vesículas multilamelares

SUV: vesículas pequenas unilamelares

LUV: vesículas grandes unilamelares

SFM: sistema fagocítico mononuclear

MRB: modificador de resposta imunológica

células NK: células *Natural Killer*

i.p.: via intraperitoneal

s.c.: via subcutânea

P JU: polissacarídeo da goma de cajueiro *Anacardium occidentale*

R. celastri: *Ramalina celastri*

DS: grau de substituição

M_w: massa molecular

α-Glucana-SO₄: derivado sulfatado da α-glucana extraída de *R. celastri*

PEC: células do exsudado peritoneal

WGA: *wheat germ agglutinin*

Con A: Concanavalina A

PC: fosfatidilcolina

CH: colesterol

SA: estearilamina

APES: 3-amino-propiltriethoxi-silano

HE: Hematoxilina e Eosina

TM: Tricrômico de Masson

PBS: solução salina tamponada com fosfato

DAB: diaminobenzidina

TNF: Fator de Necrose Tumoral

RESUMO

Lipossomas são vesículas formadas por fosfolipídios, adicionados ou não de colesterol e lipídios com carga, que encapsulam um compartimento aquoso. Os lipossomas podem carrear fármacos hidrofílicos e hidrofóbicos. Uma variedade de polissacarídeos de diversas origens têm a habilidade de potencializar o sistema imune, comportando-se como imunomoduladores e farmacologicamente são classificados como modificadores de resposta biológica (MRB). O objetivo do presente trabalho consistiu em encapsular o derivado sulfatado de *Ramalina celastri* (α -glucana-SO₄) em lipossomas convencionais e avaliar a sua ação antihelmíntica em sua forma livre e encapsulada sobre a infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*. Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, cujos constituintes foram fosfatidilcolina de soja, colesterol e estearilamina (7:2:1) contendo α -Glucana-SO₄ (2 mg/ml). As formulações lipossomais foram submetidas a testes de estabilidade acelerada (centrifugação 3000 rpm durante 1h; estresse mecânico, 150 strokes, 48 h) e a longo prazo (ciclo gelo/degelo durante 16 h a -18°C e 8 h a 25°C \pm 1°C). As preparações foram observadas macro e microscopicamente antes e após cada teste. Nos ensaios “*in vivo*”, foram utilizados camundongos fêmeas, albino Swiss (25 \pm 2 g, idade 30-40 dias), divididos em 4 grupos: G1- tratados com α -Glucana-SO₄ livre, G2- controle NaCl 150mM, G3- tratados com α -Glucana-SO₄ encapsulada em lipossomas e G4- lipossomas vazios. Os animais foram tratados 24 horas após a infecção, sacrificados e perfundidos após 56 dias da infecção. Os parâmetros avaliados foram: excreção de ovos, número de vermes recuperados do sistema porta-hepático-mesentérico, número de granulomas hepáticos e intestinais além do padrão de marcação com lectinas nestes órgãos. Foi obtido uma taxa de encapsulação de 50% e observou-se um leve decaimento de pH (7,4 a 6,8) dos lipossomas em suspensão, ao longo de 180 dias. Os lipossomas obtidos apresentaram-se estáveis quanto aos testes de estabilidade acelerada e a longo prazo. As formulações lipossomais na forma liofilizada apresentaram-se estáveis após 60 dias. O grupo tratado com α -Glucana-SO₄ livre reduziu 90,1% na eliminação de ovos nas fezes e, em 80%, os vermes totais em relação ao grupo controle. Esses resultados foram estatisticamente iguais aos obtidos com a α -Glucana-SO₄ encapsulada. Em ambos os parâmetros (ovos excretados e vermes recuperados), o grupo lipossomas vazios apresentou efeito sobre a parasitose. Com relação ao número de granulomas hepáticos, os dois tratamentos foram eficazes reduzindo em 62% e 63%, respectivamente, em relação aos controles. Foram encontrados raros granulomas intestinais em todos os grupos, o que já era esperado pelo próprio perfil da parasitose. Quanto ao padrão de marcação com lectinas, a Con A marcou o sistema ovo-granuloma no grupo α -Glucana-SO₄ livre e encapsulada e não foi verificada esta marcação no grupo NaCl 150 mM e lipossomas vazios. Já a lectina WGA marcou o sistema ovo-granuloma em todos os grupos. Pelo exposto constata-se a atividade biológica da α -Glucana-SO₄ e que a encapsulação neste tipo de lipossoma e nestas condições experimentais causaram o mesmo efeito do polissacarídeo livre.

ABSTRACT

Liposomes have been considered successful drug carriers *in vivo*. A variety of polysaccharide act as biological response modifiers (BRM). The antischistosomal activity of the polysaccharide α -glucana-SO₄, extracted from *Ramalina celastri*, was examined. Both free and liposome-encapsulated forms of α -glucana-SO₄ were considered. Liposomes were obtained according to the lipid thin film method. The effect of the treatment with unloaded and α -glucana-SO₄-loaded liposomes on egg excretion, worm burden, hepatic and intestine granuloma formation was assessed on infected *Swiss* albino mice. Furthermore, histochemical analyses of liver and intestine were carried out using peroxidase-conjugated lectins (WGA and Con A). Swiss albino female mice (four groups, $n=10$ animals/group) were infected with about 150 cercariae of *Schistosoma mansoni*, and treated with i.p. single dose (10 mg/kg) 24 h after infection. Fifty-six days after infection, animals were sacrificed, and submitted to perfusion. Their liver and intestine were collected and submitted to histological routines. Liposomes containing 2 mg/ml α -glucana-SO₄ were manufactured with an encapsulation ratio of 50%. Parasitological analysis (eggs excretion and worms recovered) revealed that the treatment with free α -glucana-SO₄ was as efficient as its encapsulated form; nevertheless, the control group of empty-liposomes exhibited an unexpected parasitological effect. Concerning the hepatic granuloma formation, only the treatment with free and encapsulated α -glucana-SO₄ (62% and 63%, respectively), when compared to the control groups. However, a few intestine granulomas were detected. The histochemical profile of egg-granuloma system showed that Con A promoted an intense staining in hepatic cells of animals treated with free and encapsulated α -glucana-SO₄, whereas the egg-granuloma system of the control groups 150 mM NaCl and empty liposomes was not at all reconized by this lectin. . The WGA lectin, was intensely bounded with cells in egg-granuloma system for all groups. In conclusion the antischistosomal effect of the polysaccharide was characterized.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esquistossomose mansônica

A esquistossomose é uma endemia parasitária causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, o qual apresenta várias espécies adaptadas ao parasitismo, como o *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum* e o *S. mansoni*, responsável por esta parasitose no Brasil (Rey, 2002). A esquistossomose é uma das principais parasitoses humanas em todo o mundo, configurando-se como um grande problema de saúde pública (Barbosa, 2000). Trata-se de uma patologia de significância médica, social e ecológica, considerada a segunda doença de importância sócio econômica e de saúde pública em áreas tropicais e sub-tropicais, perdendo apenas para a malária (Bavia *et al.*, 2001). No Brasil, o programa de controle tradicional inclui quimioterapia em massa, controle da disseminação do hospedeiro intermediário e, ainda, práticas de higiene e prevenção que vêm sendo aplicadas por mais de 50 anos em áreas endêmicas. Tais medidas têm sido uma maneira de prevenir a mortalidade e reduzir a morbidade, porém não têm contido a expansão da doença nas áreas endêmicas (Bavia *et al.*, 2001), pois há mais de 20 anos a esquistossomose tem vitimado mais de 200 milhões de pessoas infectadas (Chitsulo *et al.*, 2000).

A distribuição geográfica da esquistossomose está relacionada com a interação entre fatores ambientais bióticos e abióticos. A doença apresenta focos de distribuição, e uma parte do ciclo requer contato com a água contendo hospedeiros intermediários infectados, como ocorre com outras zoonoses (Beck *et al.*, 2000). A esquistossomose é endêmica em 74 países, sendo estimado em 600 milhões o número de pessoas em risco. Estes dados referem-se às três principais espécies que parasitam o homem: *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium*. Como somente o *S. mansoni* existe no Brasil, podem-se considerar os

dados epidemiológicos apenas neste país, onde é estimado em oito milhões o número de casos desta patologia (Cimerman, 2001).

O ciclo evolutivo do parasita (Figura 1) é mantido por seu principal hospedeiro definitivo, o homem, e por hospedeiros intermediários, caramujos do gênero *Biomphalaria*. É através do homem infectado que saem os ovos do *S. mansoni* (aproximadamente 300 ovos/dia/fêmea). Estes ovos, em contato com a água, eclodem liberando o miracídio, embrião que tem a capacidade de nadar rapidamente em busca do caramujo, e que após penetrá-lo, transforma-se em esporocisto primário e depois, em secundário. Cerca de 30 dias após a infecção do molusco, larvas bifurcadas denominadas cercárias saem e nadam ativamente. Encontrando o homem, penetram através da pele, o que depende de um esforço mecânico e da ação de enzimas (Rey, 2002).

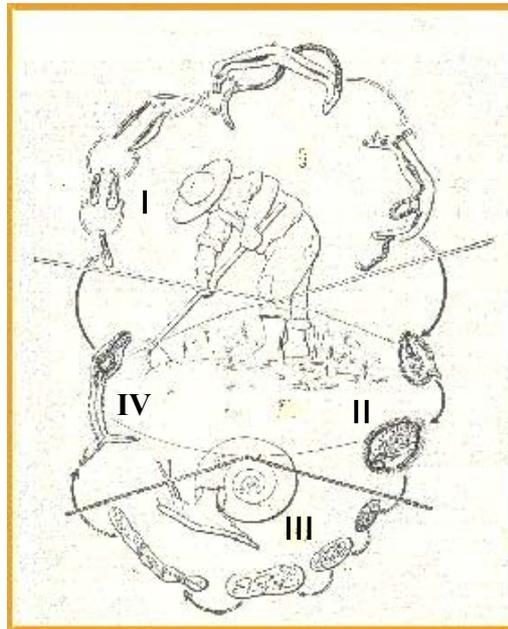


Figura 1. Ciclo evolutivo do *Schistosoma mansoni*. I, esquistossômulo transformando-se em vermes adultos; II, ovos liberando o miracídio; III, esporocisto liberados pelo caramujo; IV, cercárias liberadas pelo caramujo. (www.path.com.ac.uk/~tjs16/home-page.html)

Os esquistossômulos caem na circulação sanguínea e/ou linfática e, após aproximadamente 30 dias, vão se alojar nos vasos porta-hepático-mesentéricos. No hospedeiro definitivo, ocorre diferenciação dos sexos, sendo a fêmea de maior tamanho (1,2mm) e mais fina. A postura ocorrerá nos vasos sanguíneos da submucosa do intestino, após o alojamento da fêmea no canal ginecóforo do macho. Os ovos atravessam a parede do intestino e caem na luz desse órgão, onde se misturam às fezes, fechando assim o ciclo biológico do parasita (Neves *et al.*, 2000).

Nas diversas áreas onde a esquistossomose é endêmica, os ovos do *S. mansoni* apresentam um importante papel na transmissão, sendo ainda a causa das desordens em diversos tecidos do hospedeiro (Hirose *et al.*, 2003). A patologia é produzida pela penetração ativa das cercárias na pele humana e invasão do sistema circulatório. Os vermes adultos vivem nas veias do sistema porta-hepático podendo ser encontrados, mais frequentemente, nas veias mesentéricas inferiores. A infecção esquistossomótica ocorre em várias fases começando por alguns estágios denominados: dermatite cercariana, causada pela penetração das cercárias na pele; fase pulmonar, onde ocorre a metamorfose da cercária até chegar a fase adulta, percorrendo o coração e o pulmão até chegar ao seu habitat, o sistema porta-hepático-mesentérico. A fase aguda da doença pode-se caracterizar por um processo pulmonar discreto, durante a migração dos esquistossômulos, ou ao chegar ao fígado. A morte de alguns vermes produz obstrução embólica do vaso e conseqüente reação inflamatória. (Rey, 2002). A patologia na fase crônica é caracterizada quase que exclusivamente pelos granulomas causados pelos ovos do *S. mansoni* depositados nos tecidos do hospedeiro. Verifica-se, então, a importância da patogenia causada pelos ovos de *S. mansoni*, que vai muito além da causada pelos vermes adultos, pois cerca da metade dos ovos conseguem sair através da luz do intestino, e muitos ficam retidos nos tecidos do

indivíduo. O granuloma é o elemento anatomopatológico básico do processo esquistossomótico crônico, que se forma em torno do ovo do parasita. Inicialmente aparecem em torno dele numerosos macrófagos, seguidos de eosinófilos, linfócitos e alguns plasmócitos, que são sinais de reação imunológica. A presença do miracídio induz à acumulação local de polimorfonucleares neutrófilos, dando ao conjunto o aspecto de um microabscesso. Neste conjunto reacional formado, a princípio, quase exclusivamente por células, com predominância de linfócitos e macrófagos, começam a depositar-se fibras reticulares que se dispõem em círculo, na periferia do granuloma e, alguns fibroblastos que se orientam igualmente em camadas concêntricas e fabricam abundante quantidade de colágeno, até que, ao término de sua função, passam a fibrócitos. À medida que aumentam os fibroblastos, as demais células vão desaparecendo e, por fim, o granuloma esquistossomótico apresenta-se como uma cicatriz fibrosa de estrutura lamelar (Rey, 2002). Esta reação inflamatória cujo objetivo é a destruição do ovo, transforma-se num caos para esses tecidos, pois com a continuada oviposição pelos vermes, os granulomas logo se transformam em extensas áreas cicatriciais, o que altera totalmente a arquitetura dos órgãos.

Dependendo do tempo em que se inicie o tratamento e da carga parasitária, o indivíduo pode desenvolver a esquistossomose nas formas intestinal e hepatoesplênica.

A forma intestinal ocorre com o início da postura dos ovos e o paciente se queixa de desconforto abdominal, sensação de plenitude gástrica, leves ou intensos surtos diarreicos, que se intercalam com períodos de evacuações normais ou constipação intestinal. Quando a forma hepatoesplênica ocorre, o fígado encontra-se macroscopicamente aumentado, assim como o baço, em parte devido à congestão venosa, mas também em virtude de uma hiperplasia das células do sistema macrófago-linfocitário. Uma das conseqüências mais importantes da fibrose no fígado é criar dificuldade à passagem do sangue venoso através

desse órgão (fibrose periportal), o que acarreta congestão e edema na parede do estômago e intestino, aumento de volume do baço, bem como alterações na circulação e atividade fisiológica de outros órgãos abdominais a medida que a dificuldade circulatória aumenta, o sangue abre passagem pelas anastomoses que existem entre os sistema porta e cava. Devido a essa circulação colateral, tais anostomoses que eram quase imperceptíveis, ficam muito evidentes. Na parede do esôfago, a circulação colateral leva à formação de veias varicosas de grande calibre sujeitas à ruptura e consequentes hemorragias graves. A fase descompensada ocorre na fase mais avançada da doença, quando são observadas hemorragias digestivas, edemas e derrames cavitários, e as provas de função hepática podem acusar comprometimento dos hepatócitos (Rey, 2002).

Para o tratamento da esquistossomose mansônica, atualmente, estão disponíveis duas drogas, o oxamniquine e o praziquantel. A oxamniquine (O_x), comercialmente denominada Mansil[®], é uma tetrahydroquinolina que atua através de seus metabólitos, apenas contra o *S. mansoni*, lesando particularmente o tegumento dos vermes, sobretudo os machos, além do aparelho reprodutor das fêmeas (Malta, 1994). Seu mecanismo de ação primário parece resultar de uma ativação enzimática da droga, em um processo dependente de ATP e, em vermes sensíveis, ocorre uma alquilação de macromoléculas essenciais, inclusive o DNA (Cioli *et al.*, 1993). Os metabólitos são excretados por via renal e a O_x é efetiva em dose oral de 15 mg/Kg para cepas da América do Sul. O tratamento por O_x pode selecionar linhagens de *S. mansoni* resistentes a essa droga. Assim, em pacientes que tendo recebido a medicação correta não se curaram, é conveniente refazer o tratamento com outra droga (Rey, 2002).

O praziquantel (P_z), comercialmente denominado Biltricide[®], é uma pirazinoisoquinolina heterocíclica, que por ação direta determina contração muscular dos vermes e lesa seu tegumento, agindo, sobretudo contra as fêmeas. O tratamento faz-se com uma dose única, por via oral de 40 mg/Kg de peso do paciente, e nas infecções mais intensas, recomendam-se duas doses de 25 mg/Kg ou 30 mg/Kg, separadas por um intervalo de quatro horas. A taxa de cura da esquistossomose chega a 78% em tratamentos feitos no Brasil (Rey, 2002).

A probabilidade de haver poucas opções terapêuticas para o tratamento de uma doença que afeta 200 milhões de pessoas é alarmante. Adicionalmente, o número de relatos que indicam a possibilidade de que a resistência ao P_z seja uma realidade clínica e experimental está aumentando (Cioli, 2000). Para haver o controle da infecção por *Schistosoma*, principalmente naquelas áreas onde existem pessoas que trabalham diretamente em ambiente com potencial para a infecção, é preciso haver um contínuo tratamento em massa. Porém este tipo de tratamento regular gera o risco de desenvolvimento de resistência (Kenworthy *et al.*, 2003).

A primeira cepa isolada com resistência foi em um paciente brasileiro não curado com O_x em 1973. Nos anos seguintes relatos similares apareceram no Brasil. Em todos os casos humanos, a resistência foi demonstrada pelo isolamento de ovos fecais da cepa, seguido de tratamento na infecção experimental (Cioli *et al.*, 1993). No Egito, existem reais evidências da resistência ao P_z , ainda não esclarecida (Ismail *et al.*, 1999), pois a primeira investigação em larga escala das baixas taxas de cura com P_z foi realizada numa área infectada pelo *S. mansoni*, no norte do Senegal. Uma extensa documentação demonstrou que, neste local, houve uma taxa de cura de 18 a 39%, em vez da usual taxa de 90% (Cioli,

2000), atribuindo-se a resistência a altas taxas de reinfecções após o tratamento, o que acaba selecionando algumas cepas (Liang *et al.*, 2001). Seria muito interessante conhecer o resultado das alterações moleculares nos vermes resistentes ao P_z, pois uma explicação presumida envolveria alterações nos canais de cálcio, que é o presumido sítio de ação do P_z sobre os vermes adultos (Blair, *et al.*, 1992). Neste contexto, o desenvolvimento de novas drogas é de grande importância (Frézard & Lane, 1997).

1.2 Lipossomas

Lipossomas são vesículas microscópicas formadas por bicamadas fosfolipídicas concentricamente organizadas (Figura 2), onde podem ser incorporadas drogas lipofílicas e hidrofílicas. As drogas lipofílicas localizam-se na bicamada, enquanto as hidrofílicas são retidas no compartimento aquoso limitado pela bicamada fosfolipídica (Hrckova & Velebný, 2001). Suas características dependem do método de preparação e da escolha dos componentes da bicamada lipídica (Crommelin *et al.*, 2001).

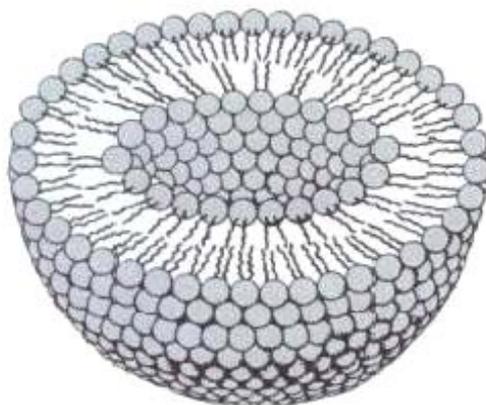


Figura 2. Estrutura de lipossomas unilamelares

(<http://www.cu.lu/labext/rcms/cppe/membrane/manalipi.html>)

Os lipossomas formam-se espontaneamente quando fosfolipídios são dispersos em um meio aquoso, dando origem a uma população de vesículas cujo tamanho pode variar numa faixa que vai de algumas dezenas de nanômetros a dezenas de micrômetros de diâmetro (Lima, 1994).

Uma caracterização mais detalhada distingue entre vesículas grandes e pequenas, permitindo classificar os lipossomas (Puisieux, 1983; Scarpa *et al.*, 1998) em:

- ◆ Lipossomas multilamelares (*Multilamellar Vesicles*: **MLV**): são os lipossomas formados por várias bicamadas concêntricas, intercaladas por compartimentos aquosos. Seu diâmetro é variável de acordo com o número de lamelas, variando entre 400 e 3.500 nm.
- ◆ Lipossomas pequenos unilamelares (*Small Unilamellar Vesicles*: **SUV**): são os menores lipossomas possíveis de serem obtidos, constituídos por apenas uma bicamada como membrana e um pequeno compartimento aquoso. Seu diâmetro varia de 20 a 50 nm.
- ◆ Lipossomas grandes unilamelares (*Large Unilamellar Vesicles*: **LUV**): são também constituídos por apenas uma bicamada, mas com uma grande cavidade aquosa. Seu diâmetro varia de 200 a 1.000 nm.

Em Bioquímica, os lipossomas possibilitam a reconstituição e investigação de proteínas de membrana em um ambiente bem definido que mimetiza o natural. A similaridade entre lipossomas e membranas biológicas pode ser aumentada por modificações químicas na membrana dos mesmos, possibilitando sua exploração em áreas como direcionamento de fármacos (Chonn & Cullis, 1998) ou modulação do sistema imune *in vivo* e *in vitro* (Meyenburg *et al.*, 2000). Entretanto, suas mais importantes aplicações são nas áreas da farmacologia, medicina e biotecnologia, onde os lipossomas servem como veículo para controlar a administração de fármacos encapsulados, material genético,

enzimas e outras moléculas. Pode-se também ter a presença de lipossomas na indústria alimentícia e cosmética, tornando possível transformar moléculas não hidrossolúveis em formulações aquosas contendo lipossomas. No campo da indústria farmacêutica, vários produtos estão sob investigação, incluindo imunomoduladores, agentes de diagnóstico e terapêuticos para câncer, antibióticos, antiasmáticos, antifúngicos e vacinas. Os lipossomas têm sido considerados uma enorme promessa para serem usados como carreadores farmacêuticos *in vivo* e o caminho a ser seguido é a prática clínica (Torchilin *et al.*, 2001; Lasic, 1992; Prista *et al.*, 1995).

Como exemplos, encontram-se na literatura vários trabalhos com a utilização de lipossomas, os quais vêm sendo utilizados para carrear o anti-helmíntico praziquantel (Ammar *et al.*, 1994), com o objetivo de avaliar o efeito sobre o tempo de meia-vida deste fármaco na circulação (Hrckova *et al.*, 2000). Paralelamente, os lipossomas têm-se apresentado um efetivo carreador para a anfotericina B (L-AMP-LRC-1), mostrando sua aplicabilidade terapêutica em pacientes com infecções fúngicas sistêmicas (Kotwani *et al.*, 2002). Também se encontra sendo usado na medicina veterinária, onde é verificado o efeito de uma glucana encapsulada em lipossomas frente à infecção por *Toxocara canis*, com o objetivo de possibilitar uma entrega específica da droga para as células do sistema fagocítico mononuclear (SFM), o qual resulta numa eficiente ativação da resposta celular e humoral (Hrckova & Velebný, 2001).

Entre as vantagens do uso do sistema de liberação controlada lipossomal pode-se verificar que estes carreadores podem dirigir um fármaco para determinados sítios específicos, prolongar a duração da exposição do fármaco, agindo como um reservatório de liberação lenta e controlada e solubilizar fármacos lipofílicos. A encapsulação em lipossomas pode também reduzir enormemente a exposição do fármaco no organismo,

protegendo o coração da doxorubicina, ou seja, da cardiotoxicidade deste fármaco. Pode-se ainda utilizar lipossomas como adjuvantes em formulações com vacinas, porém destaca-se uma característica que pode ser favorável ou desfavorável na aplicação de lipossomas, que é a captura pelo (SFM) (Lasic, 1992; Storm & Crommelin, 1998; Oussoren *et al.*, 2000).

1.3 Modificadores de Resposta Biológica: Polissacarídeos Biologicamente Ativos

Um novo caminho vem sendo proposto para o tratamento de diversas patologias a partir de substâncias que atuam modificando a resposta do hospedeiro a uma determinada doença, utilizando a resposta imune potencializada para encontrar uma melhora frente a uma determinada enfermidade. Os modificadores de resposta biológica (MRB) têm sido amplamente estudados, provenientes de diversas fontes e apresentam variados mecanismos de ação (Han *et al.*, 1999). Uma variedade de polissacarídeos de diversas origens têm a habilidade de potencializar o sistema imune, comportando-se como imunomoduladores. Farmacologicamente são classificados como (MRB) (Bohn & BeMiller, 1995). Para um agente ser classificado como MRB é necessário que o mesmo atue por meio de pelo menos um dos seguintes mecanismos: a) aumento direto da resposta anti-tumoral do hospedeiro, promovendo assim o aumento do número ou atividade das células efectoras, ou da produção de mediadores solúveis, como as citocinas; b) diminuição dos mecanismos supressores, ocorrendo o aumento indireto da resposta imune no hospedeiro ao tumor; c) aumento das defesas do hospedeiro, em virtude de seu efeito como mediador natural ou sintético das respostas imunes; d) modificação das características da membrana de células tumorais, de modo a aumentar sua imunogenicidade, alterar seus padrões de disseminação metastásica, ou torná-la mais susceptíveis a destruição por meio de mecanismos imunológicos ou por agentes citotóxicos (Mitchell, 1988).

Quanto aos seus mecanismos de ação *in vivo* e *in vitro*, polissacarídeos de diferentes origens (fungos, vegetais e líquens) e de diversas estruturas químicas, têm sido investigados, como amplamente revisado por (Whistler *et al.*, 1976; Bohn & BeMiller, 1995 e Kidd, 2000).

A glucana, um polissacarídeo de origem fúngica, líquênica ou microbiana, tem-se mostrado como um potencializador do (SFM) do hospedeiro, aumentando a resistência do hospedeiro sobre infecções virais, bacterianas e parasitoses (Hrckova & Velebný, 2001).

O mecanismo de ação *in vivo* dos polissacarídeos, ainda não foi completamente esclarecido, envolve essencialmente a imunomodulação (Han *et al.*, 1999). A imunomodulação pode ocorrer pela ativação do sistema imune envolvendo macrófagos, linfócitos T, células polimorfonucleares, interleucinas e produção de interferon, bem como aumentando a atividade fagocítica (Bohn & BeMiller, 1995; Stuelp-Campelo *et al.*, 2002). Os mecanismos de ação dos MRB sobre células neoplásicas pelo sistema imune, atua por meio de anticorpos ou principalmente por células, como linfócitos T, células NK (*Natural Killer*) e macrófagos (Rosenberg, 1993). Quanto ao mecanismo de captação dos polissacarídeos biologicamente ativos, sabe-se que as (1→3)-β-D-glucanas, administradas i.p. são gradualmente capturadas pelos macrófagos residentes no fígado e baço. Após 7 dias, 50% do polissacarídeo já pode ser detectado nessas vísceras, enquanto o restante fica acumulado no mesentério, peritônio e omento dos animais portadores de Sarcoma 180 (Suda *et al.*, 1995). O polissacarídeo permanece cerca de 30 dias no fígado e baço, sem alterações significativas em sua estrutura química (Miura *et al.*, 1995).

Neste contexto podem-se citar alguns exemplos de polissacarídeos com diversas atividades, Gadelha (2001), avaliando a ação anti-helmíntica contra o *Schistosoma mansoni*

do heteropolissacarídeo da goma do cajueiro *Anacardium occidentale* (P-JU) encontrou resultados satisfatórios, administrando o P-JU encapsulado em lipossomas, verificando uma redução no número de ovos e de vermes nos camundongos infectados com *S. mansoni*. Outro exemplo é o polissacarídeo de *Silene vulgaris* que mostrou-se um estimulador da fagocitose por macrófagos, através de diferentes mecanismos (Popov *et al.*, 1999).

1.4 Polissacarídeos de *Ramalina celastri* (*R. celastri*)

O líquen *R. celastri* (Figura 3) pode ser encontrado fixado fortemente às porções mais elevadas dos troncos das árvores. Esta espécie foi anteriormente denominada de *R. ecklonii*, *R. lanceolata* e *R. pellucida*. Em 1993, entretanto, a denominação de *R. celastri* foi estabelecida para estas espécies (Kashiwadani & Kalb, 1993).



Figura 3. Líquen *R. celastri*

Apesar de numerosos polissacarídeos de plantas com ação imunopotencializadora já ter sido demonstrado, a procura por novas fontes destes polissacarídeos biologicamente ativos é de grande interesse (Popov *et al.*, 1999).

Embora existam evidências de que as (1→3)-β-D-glucanas apresentam um maior efeito anti-neoplásico (Bohn & BeMiller, 1995), a sua relativa insolubilidade em meio aquoso dificulta sua ampla utilização clínica como MRB. O esforço em se obter estruturas mais solúveis e com atividade antitumoral justificou a pesquisa entre os líquens. Estes apresentam α- e β-glucanas com ligações glicosídicas (1→3) e (1→4), em diferentes relações molares, que podem ser um interessante objeto de investigação (Carneiro-Leão, 1998).

Ao contrário das β-glucanas, a atividade biológica das α-glucanas tem sido pouco estudada. Os líquens são importantes fontes de α-glucanas, as quais são geralmente solúveis em água e possuem estrutura linear com ligações glicosídicas do tipo α-(1→3) e α-(1→4) (Bohn & BeMiller, 1995).

As glucanas de *R. celastri* foram estudadas por Miceno (1991), sendo obtida uma α-glucana, com ligações (1→3) e (1→4) (Fig. 4), em uma proporção molar de 3:1, foram encontradas ainda evidências para a presença de uma (1→3), (1→4)-β-D-glucana linear, e de uma outra (1→3), (1→4)-α-D-glucana linear, semelhante a nigerana (Miceno, 1988).

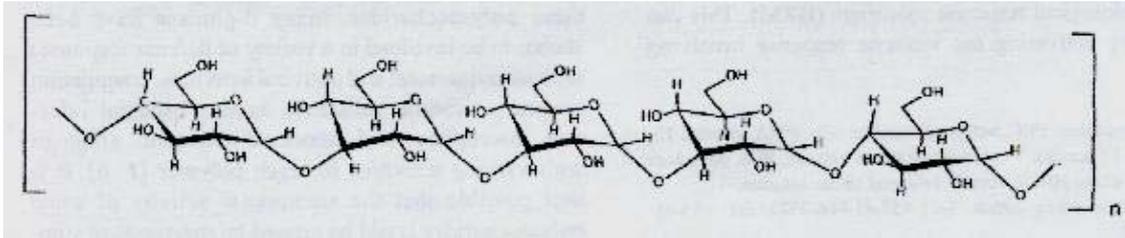


Figura 4. Estrutura do polissacarídeo extraído de *R. celastri*, Stuelp-Campelo *et al.*, 2002.

Verificando o efeito antitumoral deste polissacarídeo, observou-se uma inibição do crescimento *in vivo* do Sarcoma 180 em 81%, utilizando-se uma única administração i.p., na dose de 200 mg.kg^{-1} (Stuelp-Campelo *et al.*, 2002).

O derivado sulfatado desta α -glucana (α -glucana-SO₄, DS 0,97, M_w 290400) tem demonstrado ser mais eficaz que o polissacarídeo nativo, inibindo o crescimento de Sarcoma 180 em 59%, na dose de 20 mg.kg^{-1} (Carneiro Leão, 1998). Quando testada *in vitro* frente a células HeLa, a α -glucana-SO₄ ($10 \text{ } \mu\text{g.ml}^{-1}$) causou redução da adesividade à superfície de crescimento, com diminuição da viabilidade celular após 12 h. Foram observadas condensação celular, blebs, condensação e vacuolização do citoplasma, e alterações nucleares sugestiva de morte celular por apoptose (Carneiro-Leão *et al.*, 1997).

Stuelp-Campelo *et al.* (2002), avaliando o efeito sobre a fagocitose da α -D-glucana, trataram camundongos com uma dose única intraperitoneal (200 mg.kg^{-1}) e observaram o efeito 7 dias após a administração, observou-se um aumento de aproximadamente 70% na atividade fagocítica de células do exsudado peritoneal (PEC). Estes efeitos podem indicar que o polissacarídeo de *R. celastri* funciona como mediador da resposta inflamatória e/ou como um estimulante direto do (PEC), como proposto por Sakurai *et al.* (1992).

1.5 Histoquímica com Lectinas

Lectinas pertencem a uma classe de proteínas ou glicoproteínas de origem não-imunológica, que reconhecem carboidratos livres ou ligados às superfícies celulares através de sítios de ligação a carboidratos, na qual a principal força de interação é a hidrofobicidade (Kennedy *et al.*, 1995). Segundo Remani (1994), as lectinas podem detectar alterações na composição de carboidratos em glicoproteínas e glicolipídios de membrana celular que parecem formar a base das alterações nas adesões celulares que acompanham o desenvolvimento e transformações celulares.

As lectinas têm sido empregadas como marcadores histoquímicos para glicoconjugados da superfície celular de células normais e transformadas (Matsumoto *et al.*, 1992). Várias pesquisas têm sido desenvolvidas, no intuito de demonstrar a viabilidade e eficiência das lectinas como marcadores de células transformadas (Beltrão *et al.*, 2003).

Desta forma, o fenômeno das variações no perfil de carboidratos expressos na superfície em células transformadas estão sendo amplamente estudadas através da histoquímica com lectinas (Herling *et al.*, 2000; Thies *et al.*, 2001; Beltrão *et al.*, 1998, 2001, 2003) e se tem aplicado cada vez mais estas proteínas, principalmente de origem vegetal, como sondas histoquímicas em pesquisa, básica e aplicada, sobre processos patológicos (Kunsfield & Petzelbauer, 2001; Valentiner *et al.*, 2002) e como ferramentas auxiliares em estudos histopatológicos de rotina (Thies *et al.*, 2001).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

2.1.1 Avaliar a ação antihelmíntica de formulações contendo α -D-glucana sulfatada (α -glucana-SO₄) de *R. celastri* em sua forma livre e encapsulada em lipossomas sobre a infecção experimental pelo *S. mansoni*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Encapsular a α -glucana-SO₄ de *R. celastri* em lipossomas e testar a estabilidade (acelerada e a longo prazo) das formulações obtidas.

2.2.2. Avaliar o efeito do tratamento com formulações contendo α -glucana-SO₄ livre e encapsulada em lipossomas sobre o curso da infecção experimental pelo *S. mansoni*, quanto aos aspectos parasitológicos.

2.2.3. Acompanhar a reação inflamatória hepática e intestinal nos animais tratados com as formulações contendo α -glucana-SO₄ livre e encapsulada em lipossomas.

2.2.4. Obter padrão histoquímico de marcação das lectinas WGA e Con A do fígado e intestino de animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados com α -glucana-SO₄ livre e encapsulada em lipossomas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1-AMMAR, H. O., EL-RIDY, M. S., GHORAB, M AND GHORAB, M. M. Evaluation of the antischistosomal effect of praziquantel in a liposomal delivery system in mice. **International Journal of Pharmaceutics**, 103, 237-241, 1994.
- 2-BARBOSA, C. S. Ecopidemiologia da esquistossomose urbana na Ilha de Itamaracá, no Estado de Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, 34, 337-341, 2000.
- 3-BAVIA, M. E., MALONE, J. B., HALE, L., DANTAS, A., MARRONI, L. AND REIS, R. Use of thermal and vegetation index data from earth observing satellites to evaluate the risk of schistosomiasis in Bahia, Brazil. **Acta Tropica**, 79, 79-85, 2001.
- 4-BECK, L.R.; LOBITZ, B.M.; WOOD, B.L. Remote sensing and human health: new sensors and new opportunities. **Emerg. Inf. Dis.**, 6, 217-227, 2000.
- 5-BELTRÃO, E. I. C.; CORREIA, M. T. S.; FIGUERÊDO-SILVA, J. AND COELHO, L. C. B. B. Binding evaluation of isoform 1 from *Cratylia mollis* lectin to human mammary tissues. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, 74, 125-134, 1998.
- 6-BELTRÃO, E. I. C.; FIGUERÊDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B. AND CARVALHO-JR, L. B. Infiltrating ductal mammary carcinoma: lectin histochemistry study. **An Fac. Méd. Univ. Pernambu.**, 46, 32-35, 2001.
- 7-BELTRÃO, E. I. C.; MEDEIROS, P. L.; RODRIGUES, O. G.; FIGUERÊDO-SILVA, J.; COELHO, L. C. B. B. AND CARVALHO-JÚNIOR, L. B. *Parkia pendula* lectin as histochemistry marker for menintheelial tumor. **Europ. Jorn. Histochem.**, 43, 139-142, 2003.
- 8-BLAIR, K. L.; BENNETT, J. L AND PAX, R. A. Praziquantel: physiological evidence for its site(s) of action in magnesium-paralysed *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, 104, 59-66, 1992.
- 9-BOHN, J. A. AND BeMILLER, J. N. (1→3)-β-D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. **Carbohydr. Polym.**, 28 , 3-14, 1995.
- 10-CARNEIRO LEÃO, A. M. A. Atividade anti-tumoral dos polissacarídeos nativos e quimicamente modificados do líquen *Ramalina celastri*. 1998. 145 p. Tese (Doutorado em Bioquímica), Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- 11-CARNEIRO LEÃO, A. M. A., BUCHI, D. F., IACOMINI, M., GORIN, P. A. J., OLIVEIRA, M. B. M. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from the lichen *Ramalina celastri*. **Journal Submicroscopic Cytology and Pathology**, 29, 503-9, 1997.
- 12-CHITSULO, L., ENGELS, D., MONTRESOR, A. AND SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, 77, 41-51, 2000.

- 13-CHONN, A. AND CULLIS, P. R. recent advances in liposome technologies and their applications for systemic gene delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, 30, 73-83, 1998.
- 14-CIMERMAN, B. AND CIMERMAN, S. Parasitologia humana e seus fundamentos gerais. 2ª edição, São Paulo: Atheneu, 213-221, 2001.
- 15-CIOLI, D. Praziquantel: Is there real resistance and are there alternatives? **Current Opinion in infections diseases**, 13, 659-663, 2000.
- 16-CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L., ARCHER, S. Drug Resistance In Schistosomes. **Parasitol. Today**, 9, 162-166, 1993.
- 17-CROMMELIN, D. J., BOS, G. W. AND STORM, G. Liposomes: successful carrier
- 18-FRÉZARD, F.; MELO, A. L. de Evaluation of the schistosomicidal efficacy of liposome-entrapped Oxamniquine. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 39, 97-100, 1997.
- 19-GADELHA, M. M. S.; PROCÓPIO, A. E. A.; ARAÚJO, R. V. S.; SANTANA, J. V.; MALAGUEÑO, E.; IACOMINI, M.; MAGALHÃES, N. S. S. and CARNEIRO-LEÃO, A. M. A. Effect of free and liposome-encapsulated heteropolysaccharide from *Anacardium occidentale* L. Against experimental *S. mansoni* infection. In: PHARMATECH, 6, Recife, **Anais...**, 2001, p. 65.
- 20-HAN, S. B.; LEE, C. W.; JEON, Y. J.; HONG, N. D.; YOO, I. D.; YANG, K. AND KIM, H. M. The inhibitory effect of polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* on tumor growth and metastasis. **Immunopharmacology**, 41, 157-164, 1999.
- 21-HERLING, M.; KNOLLE, J.; BAHN, H.; GABIUS, H. J. AND HINZE, R. Glycohistochemical monitoring of chemically induced sarcomas at different stages of tumorigenesis. **In vivo**, 14, 499-506, 2000.
- 22-HIROSE, Y, KIRINOKI, M AND MATSUDA, H. Efficacy of administration of praziquantel on 2 days 2 weeks apart against *Schistosoma japonicum* eggs in mice. **Parasitology International**, 52, 141-146, 2003.
- 23-HRCKOVA, G. AND VELEBNÝ, S. Treatment of *Toxocara canis* infections in mice with liposome-incorporated benzimidazole carbamates and immunomodulator glucan. **Jornal of helminthology**, 75, 141-146, 2001.
- 24-HRCKOVA, G., VELEBNÝ, S AND GIBODA, M. Distribution of [³H]cholesterol-labelled liposomes with or without praziquantel in mice infected with *Mesocestoides corti* (Cestoda) tetrathyridia. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 126, 167-174, 2000.
- 25-ISMAIL, M.; BOTROS, S.; METWALLY, A.; WILLIAM, S.; FARGHALLY, A.; TAO, L. F. Resistance to praziquantel: Direct evidence from *Schistosoma* isolated from Egyptian villagers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 60, 932-9305, 1999.
- 26-KASHIWADANI, H., KALB, K. The genus *Ramalina* in Brazil. **Lichenologist**, 25, 1-31, 1993.
- 27-KENNEDY, J. F.; PALVA, P. M. G.; CORELLA, M. T. S.; CAVALCANTI, M. S. M. AND COELHO, L. C. B. B. Lectins, versatile proteins of recognition- a review. **Carb. Polymers**, 26, 219-230, 1995.

- 28-KENWORTHY, J. D., YE, P., WU, G. C., YU, H., SHI, Y. J., LI, H. AND COLES, G. C. Field evaluation of a test for praziquantel resistance in *Schistosoma* sp. **Veterinary Parasitology**, 113, 83-87, 2003.
- 29-KIDD, P. M. The use of mushroom glucans and proteoglycans in cancer treatment. **Altern Med Rev.**, 5, 4-27, 2000.
- 30-KOTWANI, R. N., GOKHALE, P. C., BODHE, P. V., KIRODIAN, B. G., KSHIRSAGAR, N. A. AND PANDYA, S. K. A comparative study of plasma concentrations of liposomal amphotericin B (L-AMP-LRC-1) in adults children and neonats. **International Journal of Pharmaceutics**, 238, 11-15, 2002.
- 31-KUNSFIELD, R. & PETZELBAUER, P. A unique case of a benign disseminated angioproliferation combining features of Kaposi's sarcoma and diffuse dermal angioendotheliomatosis. **Journal American Academy of Dermatology**, 45, 601-605, 2001.
- 32-LASIC, D. D. Liposomes. **Am. Sci.**, 80, 20-30, 1992.
- LIANG, YOU-SHENG, COLES, G. C., DOENHOFF, M. J. AND SOUTHGATE, V. R. in vitro responses of praziquantel-resistance and susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **International Journal for Parasitology**, 31, 1227-1235, 2001.
- 33-LIMA, E. M. AND KEDOR-HACKMANN, E. R. M. Utilidade terapêutica dos lipossomas. **Rev. Bras. Med.**, 51, 585-590, 1994.
- 34-MALTA J. Esquistossomose Mansônica. Recife: Editora Universitária, 1994.
- 35-MATSUMOTO, H.; SHIMAZU, H. AND MURAMATSUMOTO, T. Carbohydrate profiles shown by a lectin and monoclonal antibody correlates with metastatic potential and prognosis of human lung carcinoma. **Cancer**, 69, 2084-2090, 1992.
- 36-MEYENBURG, S.; LILIE, H.; PANZNER, S. AND RUDOLPH, R. Fibrin encapsulated liposomes as protein delivery system studies on the *in vitro* release behavior. **J. Control. Rel.**, 69, 159-168, 2000.
- 37-MICENO, A. M. Isolamento e caracterização de α -D-glucana e D-galactomanana do líquen *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey and Flot. Curitiba, 1988. 86 p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas, área de concentração: Bioquímica)- Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.
- 38-MICENO, A. M.; GORIN, P. A. J. AND IACOMINI, M. Galactomannan and isolichenan components of the carbohydrate-rich lichen *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey and Flot. **Agric. Biol. Chem.**, 55, 1391-13-92, 1991.
- 39-MITCHELL, M. S. Combining chemotherapy with biological response modifiers in treatment of cancer. **Journal of National Cancer Institute**, 80, 1445-1450, 1988.
- 40-MIURA, T.; OHNO, N.; SUDA, M.; MIURA, N. N.; SHIMADA, S. AND YADOMAE, T. Inactivation of (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan in mice. **Biol. Pharm. Bull.**, 18, 1297-1801, 1995.

- 41-NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, M. P. Parasitologia humana. 10ª edição, Belo Horizonte: Atheneu, 212-234, 2000.
- 42-OUSSOREN, C.; STORM, G.; CROMMELIN, D. J. A. AND SENIOR, J. 2000. Liposomes for sustained drug release. In: Sustained-release injectable products. Ed. by J Senior, M Radomsky. Engelwood, Colorado, US: Interpharm Press, p. 137-180.
- 43-POPOV, S. V., POPOVA, G. Y., OVODOVA, R. G., BUSHNEVA, O. A. AND OVODOV, Y. S. Effects of polysaccharides from *Silene vulgaris* on phagocytis. **Internacional Jornal of Immunopharmacology**, 21, 117-124, 1999.
- 44-PRISTA, L. N.; ALVES, A. C. AND MORGADO, R. **Tecnologia farmacêutica**, 4ª edição, 3, 2064-2083, 1995.
- 45-PUISIEUX, F. Les Liposomes. **Ann. Pharm. Fr.**, 41, 3-13, 1983.
- 46-REMANI, P.; PILLARI, K. R.; HASEENABEEVI, V. M.; ANKATHIL, R.; BHATTATHIRI, M. AND VIJAYAKUMAR, T. Lectin cytochemistry in the exfoliative cytology of uterine cervix. **Neoplasma**, 41, 39-42, 1994.
- 47-REY, L. Bases da parasitologia médica. 2ª edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S. A., 153-182, 2002.
- 48-ROSENBERG, S. A. Principles and applications of biologic therapy. In: DE VITA, V. T., HELLMANN, S., ROSENBERG, S. A. (eds.) **Cancer: principles & practice of oncology**. n 4. ed. Philadelphia: J. B. Lippincott, 1993, p. 276-292.
- 49-SAKURAI T, OHNO N, YODAMAE T. Intravenously administered (1→3)-β -D-glucan, SSG, obtained from *Sclerotinia sclerotio-rum* IFO 9395 augments murine peritoneal macrophage func-tion in vivo. **Chem Pharm Bull**, 40, 2120– 4, 1992.
- 50-SCARPA, M. V.; OLIVEIRA, A. G. AND CUCCOVIA, I. M. Estrutura e propriedades físico-químicas de lipossomas. **Infarma**, 7, 4-7, 1998.
- 51-STUELP-CAMPELO, P. A.; OLIVEIRA, M. B. M.; CARNEIRO-LEÃO, A. M. A.; CARBONERO, E. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. Effect of a soluble α-D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. **Int. J. Immunopharmacol**, 2, 691-698, 2002.
- 52-SUDA, T.; SHIIO, T.; MAEDA, Y. Y. AND CHIHARA, G. Antitumor activity of lentinan in murine syngeneic and autochthonous hosts and its supressive effect on 3-methylcholantrene-induced carcinogenesis. **Cancer Res.**, 44, 5132-5137, 1984.
- systems for targeted delivery of drugs. **The drug delivery companies report**, 2002.
- 43-THIES, A.; MOLL, I.; BERGER, J. AND SCHUMACHER, U. Lectin binding to cutaneous malignant melanoma: HPA is associated with metastasis formation. **Brit. J. Cancer**, 84, 819-823, 2001.
- 54-TORCHILIN, V. P.; LEVCHENKO, T. S.; LUKYANOV, A. N.; KHAW, B. A.; KLIBANOV, A. L.; RAMMOHAN, R.; SAMOKHIN, G. P. AND WHITEMAN, K. P. p-nitrophenylcarbonily-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands,

including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p- nitrophenylcarbonily groups. **Biochim. Biophys. Acta.**, 1511, 197-411, 2001.

55-VALENTINER, U.; PFULLER, U.; BAUM, C. AND SCHUMACHER, U. The cytotoxic effect of mistletoe lectins I, II and III on sensitive and multidrug resistant human colon cancer cells lines in vitro. **Toxicology**, 171, 187-199, 2002.

56-WHISTLER, R. L., BUSHWAY, A. A., SINGH, P. P., NAKAHARA, W., TOKUZEN, R. Noncytotoxic, antitumor polysaccharides. **Adv. Carbohydr. Chem. Biochem.**, 32, 235-275 , 1976.

TRABALHO A SER SUBMETIDO:
REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA
TROPICAL

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA α -D-GLUCANA SULFATADA DO LÍQUEN *Ramalina celastri* LIVRE E ENCAPSULADA EM LIPOSSOMAS FRENTE À INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Schistosoma mansoni*

R. V. S. Araújo¹, F. V. Souza-Araújo¹, Beltrão, E. I. C.¹; M. R. Melo-Júnior^{1,2}, Carvalho-JR, L. B.^{1,3}; A. M. A. Carneiro-Leão^{1,5}, M. Iacomini⁴ & N. S. Santos-Magalhães^{1,3}

¹Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE); ²Faculdade do Agreste de Pernambuco, FAAPE; ³Departamento de Bioquímica, UFPE; ⁴Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná (UFPR); ⁵Departamento de Morfologia e Fisiologia, Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE).

Dr. Nereide Stela Santos Magalhães (✉)

Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (LIKA)

Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária.

50670-901, Recife, PE, Brazil

Tel: +55-081-32718587; fax: +55-081-23718485

E-mail: nssm@ufpe.br

Financiamento: CNPq e Rede Nanobiotec-MCT.

RESUMO

O derivado sulfatado da α -D-glucana (α -glucana-SO₄) de *Ramalina celastri* livre e encapsulada em lipossomas foi testada sobre a infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*. Os lipossomas foram preparados pelo método de hidratação do filme lipídico, cujos constituintes foram fosfatidilcolina de soja, colesterol, esterilamina (36 μ Mol lipídeos/10 μ l tampão na proporção de 7:2:1, respectivamente) e α -glucana-SO₄ (2 mg/ml). As formulações lipossomais foram submetidas a testes de estabilidade acelerada e a longo prazo. Os animais utilizados foram 40 camundongos fêmeas, albino Swiss, infectados com 150 cercárias/animal, e divididos em 2 grupos controle (G2, NaCl 150mM e G4, lipossomas vazios) e 2 grupos tratados (G1, α -glucana-SO₄ livre e G3, α -glucana-SO₄ encapsulada em lipossomas). Os animais foram tratados 24 horas após a infecção e sacrificados após 56 dias da infecção. Avaliaram-se: excreção de ovos, vermes recuperados do sistema porta-hepático-mesentérico, granulomas hepáticos e intestinais e perfil histoquímico de marcação do sistema ovo-granuloma nestes órgãos com lectinas. Os lipossomas obtidos apresentaram-se estáveis com uma taxa de encapsulação de 50%. Os lipossomas apresentaram um leve decaimento de pH no período de 180 dias que variou entre 7,4 a 6,8. As formulações lipossomais liofilizadas apresentaram-se estáveis após 60 dias. Quanto aos resultados parasitológicos o grupo (G1) foi estatisticamente diferente do grupo (G2) obtendo-se uma redução de 90% no número de ovos excretados, e o (G3) foi estatisticamente igual a (G1). Este mesmo perfil foi observado quanto ao número de vermes, onde o grupo (G1) reduziu em 80% o número de vermes totais quando compara-se com o grupo (G2). Com relação ao número de granulomas hepáticos, o grupo (G1) e o (G3) reduziram em 62% e 63%, respectivamente, quando comparados aos grupos controles. Foram encontrados raros granulomas intestinais em todos os grupos, o que já era esperado pelo próprio perfil da parasitose. A lectina (Con A) marcou o sistema ovo-granuloma no grupo G1 e G3. No entanto, esta marcação não foi verificada no grupo G2 e G4. Já a lectina WGA marcou o sistema ovo-granuloma em todos os grupos estudados. Pelo exposto constata-se a atividade biológica da α -glucana-SO₄ e verifica-se que a encapsulação com este tipo de lipossoma e nestas condições experimentais causaram o mesmo efeito do polissacarídeo livre.

Palavras-chaves: atividade anti-parasitária *Schistosoma mansoni*, polissacarídeo, *Ramalina celastri*, lipossomas, Lectinas.

SUMMARY

The antischistosomal activity of the polysaccharide, α -glucana-SO₄, extracted of *Ramalina celastri* was examined. Both free and liposome-encapsulated forms of α -glucana-SO₄ were considered. Liposomes were obtained according to the lipid thin film method. The effect of the treatment with unloaded and α -glucana-SO₄-loaded liposomes on egg excretion, worm burden, hepatic and intestine granuloma formation was assessed on infected *Swiss* albino mice. Furthermore, histochemical analyses of liver and intestine were carried out using peroxidase-conjugated lectins (WGA and Con A). Swiss albino female mice (four groups, $n=10$ animals/group) were infected with about 150 cercariae of *Schistosoma mansoni*, and treated with i.p. single dose (10 mg/kg) 24 h after infection. Fifty-six days after infection, animals were sacrificed, and submitted to perfusion. Their liver and intestine were collected and submitted then to histological routines. Liposomes containing 2 mg/ml α -glucana-SO₄ were manufactured with an encapsulation ratio of 50%. Parasitological analysis revealed that the treatment with free α -glucana-SO₄ was as efficient as its encapsulated form; nevertheless, the control group of empty-liposomes exhibited an unexpected parasitological effect. Concerning the hepatic granuloma formation, only the treatment with free and encapsulated α -glucana-SO₄ (62% and 63%, respectively), when compared with control groups. However a few intestine granulomas were detected. The histochemical profile of egg-granuloma system showed that Con A promoted an intense staining in hepatic cells of animals treated with free and encapsulated α -glucana-SO₄, whereas the egg-granuloma system of the control groups 150 mM NaCl and empty liposomes was not at all reconized by this lectin. . The WGA lectin, intensely bounded with cells in egg-granuloma system for all groups. In conclusion the antischistosomal effect of the polysaccharide was characterized.

Key words: antiparasitic activity, *S. mansoni*, Polysaccharide, *Ramalina celastri*, lectins, liposomes

INTRODUÇÃO

A esquistossomose continua sendo uma das mais prevalentes infecções parasitárias no mundo e um problema significativo de saúde pública⁸. Produção de ovos, formação de granulomas, intensidade da patologia, resistência a reinfecções e a eficácia da droga são características significantes que dependem de fatores imunológicos^{15,28}. Praziquantel e oxamniquine são as drogas de escolha para o tratamento da esquistossomose, porém, a literatura relata a possibilidade de haver resistência a tais drogas. A perspectiva de haver poucas opções terapêuticas para uma doença que afeta 200 milhões de pessoas é alarmante¹⁰. Neste contexto, o desenvolvimento de novas drogas é de grande importância¹⁷. Estudos mostram que numerosos polissacarídeos de diferentes origens biológicas podem atuar como modificadores de resposta biológica (MRB). Isto ocorre por ativação da resposta imune envolvendo macrófagos, células T e células *Natural Killer*, interleucinas e produção de interferon, bem como aumentando a atividade fagocítica⁵. Os líquens são promissores fontes de α -glucanas, as quais são geralmente solúveis em água e possuem estrutura linear com ligações glicosídicas do tipo α -(1 \rightarrow 3) e α -(1 \rightarrow 4)³⁶. Recentemente, interessantes efeitos citotóxicos sobre células HeLa têm sido descritos para uma α -D-glucana, isolada do líquen *Ramalina celastri*⁷. Este polímero, com ligações do tipo (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4), na proporção molar 3:1, tem mostrado atividade citotóxica sobre células HeLa, atividade fagocitária, efeito antitumoral sobre Sarcoma-180 e sobre células do exsudado peritoneal, o que sugere que a glucana de *R. celastri* exerça um papel de MRB³⁷.

Os lipossomas são considerados promissores carreadores de droga *in vivo*³⁹. Formulações lipossomais contendo anfotericina B ou doxorubicina são exemplos de sucesso na aplicação da nanotecnologia farmacêutica em terapias. Lipossomas

administrados por via intravenosa são rapidamente capturados pelos macrófagos, o que constitui uma grande vantagem no caso da encapsulação de um MRB²⁴. A administração de glucanas encapsuladas em lipossomas permite uma entrega específica do fármaco ao sistema fagocítico mononuclear, tendo como resultado uma eficiente ativação da resposta imune celular e humoral¹⁶.

Lectinas pertencem a uma classe de proteínas ou glicoproteínas de origem não-imunológica, que reconhecem carboidratos livres ou ligados às superfícies celulares através de sítios de ligação a carboidratos, na qual a principal força de interação é a hidrofobicidade²³. Lectinas têm capacidade de reconhecer carboidratos podendo ser utilizada como marcador histoquímico para glicoconjugados de superfície celular em doenças inflamatórias^{42,30}.

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antihelmíntico de α -glucana-SO₄ livre e encapsulada sobre a infecção experimental por *S. mansoni* em camundongos, avaliou-se a excreção de ovos, o número de vermes recuperados do sistema porta-hepático-mesentérico, e o perfil histopatológico e histoquímico do fígado e intestino.

MATERIAIS E MÉTODOS

Extração, purificação, sulfatação e caracterização do polissacarídeo extraído do líquen *R. celastri*

Os procedimentos realizados para extração e purificação do polissacarídeo de *R. celastri* foram realizados segundo Miceno (1988)²⁹, emodificado por Stuelp (1997)³⁵. A α -D-glucana foi sulfatada de acordo com o procedimento descrito por O'Neill (1955)³¹, tendo como produto a α -glucana-SO₄, que teve grau de substituição por sulfato determinado

segundo a metodologia descrita por Dodgson & Price (1962)¹³. A sulfatação da α -glucana-SO₄ foi analisada por ressonância magnética nuclear de Carbono-13 (RMN-¹³C).

Preparação dos lipossomas

Fosfatidilcolina de soja (Lucas Meyer, Hamburg, Germany), colesterol e estearilamina (Sigma, Saint Louis, USA), clorofórmio e metanol foram obtidos da Merck (Armstadt, Germany).

Os lipossomas foram preparados pelo método de formação do filme lipídico por evaporação de solventes orgânicos². Lipossomas carregados positivamente foram preparados como segue: inicialmente os constituintes lipídicos, fosfatidilcolina de soja, colesterol e esterilamina (7:2:1) foram solubilizados em um sistema clorofórmio:metanol 3:1 (v/v) e mantidos sob agitação mecânica, a 28°C, durante 15 minutos. A concentração de lipídios utilizada variou entre 32 a 42 μ mol (Tabela 1) em 10 μ l de solução tampão fosfato de sódio, 0,2 M, pH 7,4. A solução obtida foi evaporada por 40 minutos (37°C), em evaporador rotativo, com o objetivo de eliminar o sistema solvente formando, assim, o filme lipídico. Este foi hidratado com o mesmo tampão contendo α -glucana-SO₄ (1,0 a 2,0 mg/ml), mantido sob agitação mecânica por 40 minutos, a 28°C. Finalmente, as preparações foram submetidas à ultrasonicação, 50 ciclos/segundo, durante 250 segundos, a 4°C. As preparações lipossomais foram liofilizadas (sistema FTSS, USA).

Tabela 1. Formulações lipossomais

	composição (7:2:1)	[lipídios/tampão] (μ mol. μ l)	α -Glu-SO ₄ (mg.ml)
F1	PC:CH:SA	36	1,0
F2	PC:CH:SA	36	1,5
F3	PC:CH:SA	36	0
F4	PC:CH:SA	36	2,0
F5	PC:CH:SA	32	2,0
F6	PC:CH:SA	32	0
F7	PC:CH:SA	42	1,0
F8	PC:CH:SA	42	0

Estabilidade das formulações lipossomais contendo α -glucana- SO_4

Os testes de estabilidade foram realizados imediatamente após a preparação das formulações. Foram analisados aspectos macro e microscópicos, variação de pH e taxa de encapsulação. Testes de estabilidade acelerada e a longo-prazo também foram realizados, com o objetivo de avaliar a durabilidade das formulações, submetidas a condições de estresse, simulação de condições de transporte e estocagem. O primeiro teste foi o de estabilidade acelerada por centrifugação (3000 rpm/min por 1 hora), seguido de estresse mecânico (150 strokes/min, 37°C por 48 horas). Foram separadas alíquotas das formulações para os testes de estabilidade a longo-prazo, como, ciclo de congelamento e descongelamento (16 h a -18°C e 8 h a 25°C \pm 1°C) e análise do pH em formulações estocadas por 6 meses a 4°C.

A taxa de encapsulação de α -glucana- SO_4 foi determinada após ultracentrifugação (44.000 rpm, 1 hora). O teor de α -glucana- SO_4 foi determinado pelo método do fenol-sulfúrico¹⁴, após a separação da α -glucana- SO_4 não encapsulada por ultracentrifugação. Uma curva de calibração padrão foi preparada utilizando-se D-glicose como padrão em concentrações variando de 8 a 80 $\mu\text{g/ml}$.

Avaliação da atividade biológica da α -glucana- SO_4

Camundongos fêmeas *Swiss* albinos, com peso 25 \pm 2.0 g, idade entre 35-40 dias, foram infectados por via caudal com 150 cercárias/animal (cepa BH) de *S. mansoni*. Os animais foram tratados com dose única (10 mg.kg⁻¹), 24 horas após a infecção. Quatro grupos (n=10) foram estudados: G1, α -glucana- SO_4 livre; G2, NaCl 150 mM; G3, α -glucana- SO_4 encapsulada em lipossomas e G4, lipossomas vazios. A infecção dos animais

foi confirmada e a atividade da α -glucana-SO₄ foi avaliada pela eliminação de ovos nas fezes determinada pelo método de Kato-Katz²². Após 56 dias de infecção os animais foram anestesiados usando cloridrato de xilazina e cloridrato de quetamina nas doses de 10 mg.Kg⁻¹ e 115 mg.Kg⁻¹ por via subcutânea, sacrificados e então submetidos a perfusão. Onde os vermes distribuídos no sistema porta-hepático, foram recuperados¹⁷ e os órgãos coletados para análises histopatológica e histoquímica.

Análise histopatológica

Fragments do fígado e intestino foram fixados em formaldeído 10% (v/v) e submetidos a rotina histológica e embebidos em parafina. Tecidos (fígado e intestino) com 4 μ m foram preparadas em lâminas tratadas com 3-amino-propiltriethoxi-silano (APES; Sigma, USA) e coradas com hematoxilina e eosina e Tricrômico de Masson. A análise histopatológica foi realizada em microscópio óptico, onde os granulomas foram contados.

Histoquímica hepática e intestinal usando lectinas

Foram usadas as lectinas Concanavalina A (Con A) e *wheat germ agglutinin* (WGA) conjugadas a peroxidase (Sigma, USA). Os tecidos hepático e intestinal foram desparafinizados em xilol e embebidas em etanol (70-100%). As lâminas foram tratadas com solução de tripsina 0,1% (p/v) por 2 minutos a 37°C, logo após foram tratadas com metanol 0,3% (v/v) por 20 min a 25°C e incubado com as lectinas conjugadas com peroxidase (Con A e WGA 100 μ g/ml) por 2h a 4 °C. As lâminas foram então lavadas com PBS 10 mM (10 min), A peroxidase foi revelada através da incubação em PBS contendo diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (3-5 min). Os tecidos hepáticos e

intestinais foram, então, contracorados com hematoxilina e analisados ao microscópio óptico (Olympus BH-2, Japan). O ensaio de inibição de reconhecimento da lectina ao carboidrato, foi realizada usando o açúcar específico correspondente a lectina: D-manose e D-glicose para Con A, N-acetil-glicosamina para WGA, para uma concentração final de 300 mM.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos como média \pm desvio padrão ($M \pm dp$), submetidas à análise de variância e ao teste de Tukey, considerando-se estatisticamente significativos os valores comparados ao nível de significância de 5%⁴⁰. Letras iguais no par de comparação (*a* ou *b*) indicam $p > 0,05$; letras diferentes (*a* e *b*), indicam $p \leq 0.05$.

RESULTADOS

Estabilidade dos lipossomas contendo α -glucana-SO₄

Foi observado que as formulações permaneceram estáveis após o estresse mecânico, o qual simula condições de transporte, exceto a F5 (Tabela 2). Dentre todas as formulações a que foi estável em todos os parâmetros e inclusive com maior número de ciclos de congelamento e descongelamento foi a F4, a qual foi escolhida para os testes *in vivo*.

Esta formulação (F4) liofilizada mostrou-se homogênea quanto aos aspectos macro e microscópicos após ressuspensão em tampão fosfato de sódio pH 7,4 após 60 dias de armazenamento. Esta formulação em suspensão demonstrou um leve decréscimo de pH durante um período de 180 dias, variando de 7,4 a 6,5 (Figura 1), isto pode indicar uma degradação lipídica gradual³². Porém esta mesma formulação da forma liofilizada

apresentou o mesmo pH (7,4) após liofilização e ressuspensão. A taxa de encapsulação da formulação F4 foi de 50%, o qual é considerada satisfatória para lipossomas SUV.

Tabela 2. Avaliação de formulações contendo α -glucana-SO₄ nos testes de estabilidade acelerada e a longo-prazo.

	estresse (48h)	centrifugação (3000 rpm-1h)	Ciclos gelo/degelo (16h-18°C; 8h25°C)
F1	estável	estável	até 1 ciclo
F2	estável	estável	até 1 ciclo
F3	estável	estável	até 1 ciclo
F4	estável	estável	>6 ciclo
F5	precipitado	precipitado	até 2 ciclo
F6	estável	estável	0 ciclo
F7	estável	estável	até 4 ciclo
F8	estável	precipitado	até 4 cicle

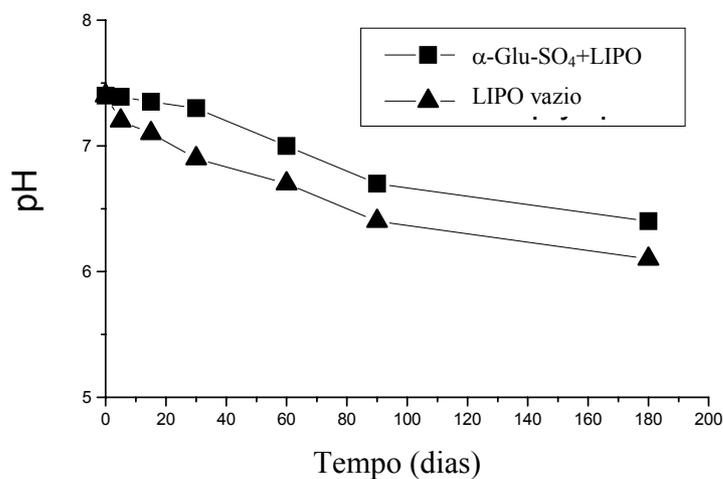


Figura 1. Acompanhamento do pH da suspensão lipossomal contendo α -glucana-SO₄ (F4), estocada a 4 °C.

Eficácia da α -glucana-SO₄ livre e encapsulada sobre a infecção experimental por *S. mansoni*

A Figura 2 ilustra a eliminação de ovos nas fezes de camundongos infectados por *S. mansoni*. O tratamento com a α -glucana-SO₄ livre promoveu uma redução significativa de 90,1% ($p= 0.000164$) quando comparados ao grupo controle NaCl 150 mM. Não foi verificado uma diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos com a α -Glucana-SO₄ livre e encapsulada em lipossomas.

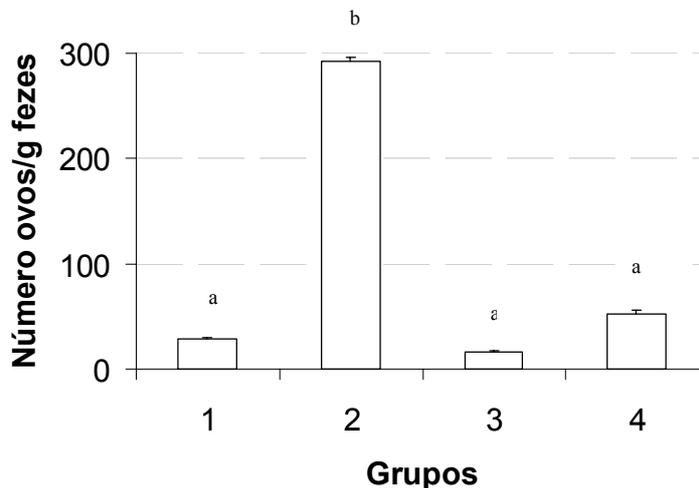


Figura 2. Efeito dos tratamentos com a α -glucana-SO₄ livre e encapsulada em lipossomas sobre o número médio de ovos excretados nas fezes dos animais infectados por *S. mansoni*. 1, α -glucana-SO₄ livre; 2, NaCl 150 mM; 3, α -glucana-SO₄ encapsulada e 4, lipossomas vazios. Letras iguais no par de comparação (*a* ou *b*) indicam $p > 0,05$; letras diferentes (*a* e *b*), indicam $p \leq 0.05$

Os vermes recuperados do sistema porta-hepático-mesentérico foram contados e classificados por sexo, como está mostrado na tabela 3. Pode-se observar uma redução estatisticamente significativa no número de vermes totais, fêmeas e machos, no grupo α -

glucana-SO₄ livre, na ordem de 80,2%, 70,9% e 73,4%, respectivamente, quando se compara os dados com o grupo controle NaCl 150 mM. Neste caso, também não foi verificada diferença entre os dados do tratamento com o polissacarídeo livre e encapsulado. Um efeito não esperado foi observado no grupo lipossomas vazios que causaram redução na eliminação de ovos e no número de vermes recuperados, o que não foi observado no número de granulomas.

Tabela 3. Efeito dos tratamentos com a α -glucana-SO₄ livre e encapsulada em lipossomas sobre o número médio de vermes recuperados do sistema parta-hepático-mesentérico dos animais infectados por *S. mansoni*.

Tratamento	Vermes adultos recuperados		
	machos	fêmeas	totais
α -glu-SO ₄	5.8 ± 1.9 ^a	5.4 ± 3.4 ^a	9 ± 2.2 ^a
Controle (0.1M NaCl)	21.8 ± 3.7 ^b	18.6 ± 5.1 ^b	45.6 ± 10.1 ^b
α -glu-SO ₄ – + Lipossomas	3 ± 1.1 ^a	1.75 ± 0.5 ^a	4.75 ± 0.9 ^a
Lipossomas vazios	4.6 ± 1.5 ^a	4.4 ± 1.5 ^a	14 ± 3.3 ^a

Letras iguais no par de comparação (*a* ou *b*) indicam $p > 0,05$; letras diferentes (*a* e *b*), indicam $p \leq 0.05$

Análise Histopatológica

As observações histopatológicas permitiram a visualização de granulomas em diferentes estágios de evolução. Quanto ao número de granulomas hepáticos (Figura 3A), o grupo tratado com o polissacarídeo livre teve uma redução estatisticamente significativa observando-se uma taxa de redução na ordem de 62,0% ($p= 0,007336$) em relação ao grupo controle NaCl 150 mM. Neste mesmo parâmetro, porém, o grupo α -glucana-SO₄

encapsulada foi estatisticamente diferente do grupo lipossomas vazios, apresentando uma redução de 63% ($p=0,029527$).

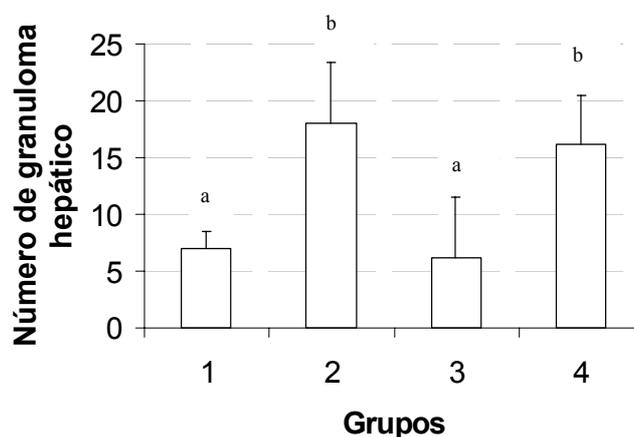


Figura 3A. Efeito dos tratamentos com a α -glucana-SO₄ livre e encapsulada em lipossomas sobre o número médio de granulomas hepáticos. 1, α -glucana-SO₄ livre; 2, NaCl 150 mM; 3, α -glucana-SO₄ encapsulada e 4, lipossomas vazios. Letras iguais no par de comparação (*a* ou *b*) indicam $p > 0,05$; letras diferentes (*a* e *b*), indicarão $p \leq 0,05$

Vale ressaltar que, quanto ao número de granulomas hepáticos, o grupo lipossomas vazios foi estatisticamente igual ao grupo controle NaCl 150 mM, ou seja, não teve efeito sobre a patologia hepática causada por *S. mansoni*, que é a causa principal das complicações hemodinâmicas nos portadores da doença, a qual causa hipertensão portal e varizes no esôfago, muitas vezes levando o indivíduo à morte.

Na Fig. 3 B foram observados poucos granulomas no intestino dos grupos controle e tratado, sendo estatisticamente iguais, o que já era esperado pelo próprio perfil da parasitose. Estes granulomas, diferentes dos encontrados no fígado, apresentavam-se ainda bem formados, enquanto que os do fígado apresentavam extensas áreas de necrose e ovos em degeneração.

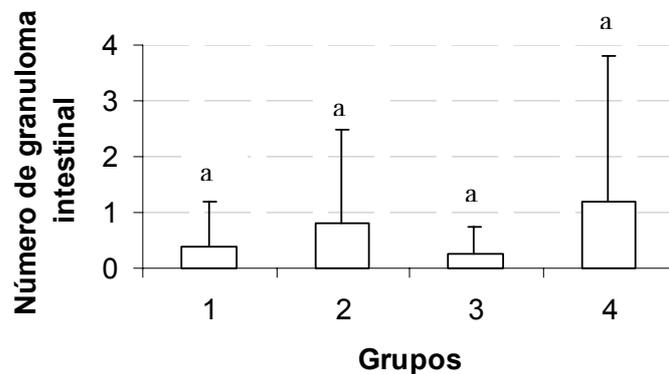


Figura 3B. Efeito dos tratamentos com a α -glucana-SO₄ livre e encapsulada em lipossomas sobre o número médio de granulomas intestinais. 1, α -glucana-SO₄ livre; 2, NaCl 150 mM; 3, α -glucana-SO₄ encapsulada e 4, lipossomas vazios. Letras iguais no par de comparação (*a* ou *b*) indicam $p > 0,05$; letras diferentes (*a* e *b*), indicarão $p \leq 0,05$

Os resultados demonstraram que ambos os tratamentos possuem efeito contra a parasitose, ainda que, nestas condições experimentais, a utilização deste tipo de lipossomas não tenha alterado a eficácia do polissacarídeo. Talvez a utilização de uma outra variedade de lipossoma possa demonstrar um perfil diferente sobre o tratamento da esquistossomose.

Análise Histoquímica

Os resultados da marcação histoquímica com lectinas (Tabela 4) demonstrou que a WGA, uma lectina específica para N-acetilglicosamina, marcou intensamente células do sistema ovo-granuloma em todos os grupos. Com A, que reconhece resíduos de α -D-manose e D-glicose, mostrou uma intensa marcação citoplasmática no grupo α -glucana-SO₄ livre (Figura 4A), enquanto o sistema ovo-granuloma do grupo controle NaCl 150 mM não foi reconhecido por esta lectina (Figura 4B). Esta mesma lectina marcou intensamente o sistema ovo-granuloma no outro grupo tratado α -glucana-SO₄ encapsulada (Figura 5A) e não marcou o grupo lipossomas vazios (Figura 5B).

Tabela 4. Padrão de reatividade de sistemas ovo-granuloma hepáticos e intestinais em camundongos tratados com α -glucana-SO₄ livre e encapsulada em lipossomas.

Grupo	WGA		Con A	
	Intestino	fígado	Intestino	fígado
α -glucana-SO ₄	+	+	+	+
NaCl 150 mM	+	+	-	-
α -glucanaSO ₄ -Lipo	+	+	-	-
Lipossomas vazios	+	+	-	-

(+), reativo; (-), não reativo

Figura 4. Padrão de marcação de con A sobre o sistema ovo-granuloma hepático no grupo tratado com α -glucana-SO₄ (A) e grupo NaCl 150 mM (B). 400×

Figura 5. Padrão de marcação de con A sobre o sistema ovo-granuloma hepático no grupo tratado com α -glucana-SO₄ encapsulada (A) e grupo lipossomas vazios (B). 400×

DISCUSSÃO

No presente trabalho a α -glucana-SO₄ foi encapsulada com sucesso em lipossomas convencionais e foi testada sobre a infecção experimental por *S. mansoni*, apesar da literatura citar as baixas taxas de encapsulação (30%-35%) em lipossomas SUV¹¹, uma alternativa para aumentar a taxa de encapsulação é a inclusão de colesterol e lipídios carregados, que aumenta o volume de captura do fármaco³⁸. Portanto, foram utilizados o colesterol e a estearilamina com carga positiva na preparação dos lipossomas contendo α -glucana-SO₄.

A α -glucana-SO₄ livre mostrou-se eficaz tanto quanto α -glucana-SO₄ encapsulada, nos aspectos estudados: ovos excretados, vermes e granulomas hepáticos. Estes resultados demonstram que o tipo de lipossoma utilizado não potencializou a ação do fármaco encapsulado, porém este efeito foi verificado com apenas 50% da α -glucana-SO₄ encapsulada, sugerindo que se a taxa de encapsulação fosse maior o efeito do tratamento com α -glucana-SO₄ encapsulada seria muito mais eficaz. Provavelmente, tentando-se encapsular a α -glucana-SO₄ em lipossomas com maior capacidade de encapsulação, possa-se verificar tal efeito. Dentre os resultados apresentados ressalta-se a redução no número de granulomas nos grupos dos animais tratados com o polissacarídeo, onde sabe-se que em torno dos ovos de *S. mansoni*, não eliminados com as fezes do hospedeiro vertebrado, há formação de intensa reação inflamatória de caráter imune (granuloma)⁴⁴. Este resultado pode sugerir que a α -glucana-SO₄ possui atividade biológica, pois as glucanas têm mostrado estimular o sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro, ainda aumentando a resistência sobre vírus, bactérias e infecções parasitárias. Na literatura existem alguns relatos da ação biológica de alguns polissacarídeos como a lentinana, uma (1→3)- β -D-

glucana extraída da parede celular de *Lentinus edodes* com atividade antitumoral. O efeito desse polissacarídeo ocorre pela potencialização da atividade dos macrófagos e aumento das funções dos linfócitos T auxiliares (CD4⁺), geração de células T citotóxicas (CD8⁺), e células *Natural Killer*^{12,19,21,20}. Tais efeitos, em conjunto, causam uma regressão rápida no tumor (Sarcoma 180), com perda acentuada de elementos celulares⁴. Existe ainda o aumento da produção das citocinas IL-1 e Fator de Necrose Tumoral (TNF) por monócitos periféricos após a administração da lentinana³, existe redução da disseminação metastática, provavelmente por estimulação de macrófagos citotóxicos²⁵. Os relatos sobre os mecanismos de ação de alguns polissacarídeos podem sugerir o provável mecanismo de ação de α -glucana-SO₄, porém só com estudos imunológicos no futuro próximo, poderá comprovar-se o mecanismo de ação deste polissacarídeo.

Trabalhos prévios realizados em nosso laboratório demonstraram a eficácia e lectinas como marcadores histoquímicos do sistema ovo-granuloma em animais infectados por *S. mansoni*^{18,34}. Néri e colaboradores (2002)¹⁸, utilizando a lectina WGA, observaram a marcação no sistema ovo-granuloma presente no fígado de animais não tratados, infectados pelo *S. mansoni*. Comparando-se estes resultados com os do presente trabalho, pode-se sugerir a presença de N-acetilglicosamina no sistema ovo-granuloma dos animais tratados com o polissacarídeo e dos controles (NaCl 150 mM e lipossomas vazios).

Os grupos tratados com α -glucana-SO₄ (livre e encapsulada) apresentaram um padrão de marcação intenso com a Con A no sistema ovo-granuloma, o que não foi observado nos grupos controle.³⁴ Souza-Araújo e colaboradores (2003), analisando o perfil de marcação com a Con A no fígado de camundongos tratados com um heteropolissacarídeo extraído da goma do cajueiro *Anacardium occidentale* (P JU)

encapsulado em lipossomas, também verificaram uma intensa marcação na cutícula do ovo de *S. mansoni*, fato este não verificado no grupo tratado com lipossomas vazios. Estes resultados estão de acordo com ¹⁸Neri e colaboradores (2002), os quais trabalhando com a lectina Con A para a análise do perfil de glicosilação do sistema ovo-granuloma em animais não tratados e infectados por *S. mansoni*, constataram que esta lectina não marcou tal sistema. Este resultado sugere que o tratamento com o polissacarídeo seja livre ou encapsulado, altera o padrão de glicosilação do sistema ovo-granuloma. Evidências experimentais sugerem que os carboidratos da superfície das células estão envolvidos no processo de reconhecimento entre parasita e hospedeiro, e esta mudança induz modificações estruturais e funcionais nas células do hospedeiro⁴³.

O grupo controle lipossomas vazios quando comparado ao grupo controle 150 mM NaCl, apresentou atividade em alguns parâmetros avaliados, o que ainda não está explicado. Porém, têm-se relatos que a resposta de macrófagos é potencialmente estimulada por lipopolissacarídeos⁹. Assim, este efeito poderia estar relacionada com a ação de várias famílias de lipopolissacarídeos, os quais são potentes imunomoduladores, que apresentam atividade antibacteriana, antifúngica e antiviral³³, o que se deve tanto ao polissacarídeo, como também à porção lipídica. Também se encontram na literatura relatos de atividade biológica de alguns compostos lipídicos, como o ácido asiático, um esteróide natural extraído da *Centella asiática* e que tem sido utilizado como cicatrizante^{41,6}, protegendo a pele após queimaduras e injúrias. O mecanismo básico desta proteção inclui uma mudança na produção de matrix extracelular^{26,27}. Este resultado, que não era esperado no grupo lipossomas vazios, pode também ser associado a sua biodistribuição no organismo, o qual é logo capturado pelo sistema fagocítico mononuclear (macrófagos), o que pode, estimular o sistema imune ¹¹.

Muitos trabalhos mostram a importância da encapsulação em lipossomas e inclusive sua ação destes sobre fármacos já conhecidos na clínica médica, como por exemplo, um conhecido esquistossomicida, o oxamniquine, que foi encapsulado em lipossomas convencionais (LOXA), e testado durante o curso da infecção experimental pelo *S. mansoni*. Verificou uma redução significativa do número de vermes totais recuperados no grupo tratado com LOXA, quando comparados ao grupo controle lipossomas vazios e oxamniquine livre. O efeito máximo de LOXA, com 97% de redução da carga parasitária, foi observado quando administrada um dia antes da infecção, enquanto que os resultados com a oxamniquine livre não foram significativos nestas condições¹⁷. Outro importante resultado foi a encapsulação do praziquantel em lipossomas, onde camundongos foram tratados subcutaneamente com a droga livre e encapsulada antes da infecção por *S. mansoni*. Foi verificado que o tratamento com a droga encapsulada teve uma ação profilática e que os animais tratados com a droga encapsulada obtiveram uma maior sobrevivência e um menor número de vermes hepáticos estatisticamente significativo¹. Concluiu-se que a encapsulação de ambos os fármacos anti-schistosoma foi de grande valor para o tratamento da esquistossomose experimental.

O presente trabalho contribui com uma nova possibilidade de ação biológica para α -glucanas, já que polissacarídeos com tal estrutura são ainda pouco estudados, tendo-se na literatura relatos de ação antitumoral e atividade fagocítica³⁷. Porém a atividade antihelmíntica é uma nova proposta, ainda que seu mecanismo de ação não esteja elucidado. Há muito que se investigar, principalmente do ponto de vista imunológico, para que se explique o mecanismo de ação de polissacarídeos.

Os resultados apresentados sugerem que a α -glucana-SO₄ pode ser utilizada livre ou em terapia combinada com oxamniquine ou praziquantel, o qual poderá promover uma acentuada atividade antihelmíntica. De acordo com tais resultados, a escolha da α -glucana-SO₄ livre é mais conveniente do ponto de vista econômico, de acordo com o custo-benefício de ambos os tratamentos utilizados. No entanto, a proposta para se realizar outros tipos de lipossomas, é interessante, para verificar se com um aumento da taxa de encapsulação, os resultados com o polissacarídeo livre é superado, pois isto seria de grande valor para os estudos de novos compostos com atividade anti-esquistossomal.

Agradecimentos:

Ao CNPq, pelo Grant 33496-01 (Nereide Stela Santos Magalhães), e as bolsas de Rosangela Vidal de Souza Araújo (mestrado) e Fernanda Vidal de Souza Araújo (PIBIC-CNPq/UFRPE); Ao apoio financeiro do Banco do Nordeste BNB e rede Nanobiotec. Este trabalho também foi parcialmente financiado pelo CNPq-PRONEX (Estrutura e propriedades dos Carboidratos, UFPR).

REFERENCES

- 1-Ammar HO, El-Ridy MS, Ghorab M, Ghorab MM. Evaluation of the antischistosomal effect of praziquantel in a liposomal delivery system in mice. *International Journal of Pharmaceutics* 103: 237-241, 1994.
- 2-Amselem S, Gabizon A, Barenholz Y. Optimization and upscaling of doxorubicin-containing liposomes for clinical use. *Am. Pharm. Assoc* 79: 1045-1052, 1990.
- 3-Arinaga S, Karimine N, Takamuku K, Nanbara S, Nagamatsu M, Ueo H, Akiyoshi T. Enhanced production of interleukin 1 and tumor necrosis factor by peripheral monocytes after lentinan administration in patients with gastric carcinoma. *International Journal of Immunopharmacology* 14: 43-47, 1992.
- 4-Baba H, Kunimoto T, Niita K, Sato K, Hashimoto S, Kohno M, Kita Y, Ogawa H. Rapid tumor regression and induction of tumor-regressing activity in serum by various immunomodulating agents. *International Journal of Immunopharmacology* 8: 569-572, 1986.
- 5-Bohn JA, BeMILLER JN. (1→3)- β -D-Glucans as biological response modifiers: a review of structure-functional activity relationships. *Carbohydrate Polymers* 28: 3-14, 1995.
- 6-Bonte F, Dumas M, Candagne G, Meybeck A. Influence of asiatic acid, madecassic acid, and asiaticoside on human col-lagen I synthesis. *Planta Med* 60: 133 –5, 1994.
- 7-Carneiro-Leão AMA, Buchi DF, Iacomini M, Gorin PAJ, Oliveira MBM. Cytotoxic effect against HeLa cells of polysaccharides from lichen *Ramalina celastri*. *Journal Submicroscopy Cytol Pathol* 29: 503-509, 1997.
- 8-Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* 77: 41-51, 2000.

9-Cho MK, Sung Min-A, Kim DS, Park HG, Jew SS, Kim SG. 2-Oxo-3,23-isopropylidene-asiate (AS2006A), a wound-healing asiate derivative, exerts anti-inflammatory effect by apoptosis of macrophages, *International Immunopharmacology* 3: 1429–1437, 2003.

10-Cioli D. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? *Current opinion in infectious diseases* 13, 659-663, 2000.

11-Crommelin DJ, Bos GW, Storm G. Liposomes: successful carrier systems for targeted delivery of drugs. *The drug delivery companies report*, 2002.

12-Dennert G, Tucker D. Antitumor polysaccharide lentinan – a T-cell adjuvant. *J. Natl. Cancer Institute* 51: 1727-1729, 1973.

13-Dodgson KS, Price RG. A note on the determination of the sulphated ester content of sulphated polysaccharides. *Biochemical Journal* 84: 106-109, 1962.

14-Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28: 350, 1956.

15-Dunne DW, Hagan P, Abath FGC. Prospects for immunological control of schistosomiasis. *Lancet* 345: 1488-1491, 1995.

16-Ferencík M, Kotulová D, Masler L, Sandula J, Pruzinec P. Immunomodulatory effect of glucans on professional phagocyte. *International Journal of Immunopharmacology* 89: 424-432, 1988.

17-Frézard F, Melo AL. Evaluation of the schistosomicidal efficacy of liposome – entrapped oxamniquine. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 39: 97-100, 1997.

18-Neri DFMG, Guimarães MT, Melo-Júnior MR, Pontes-Filho NT, Carvalho-Júnior LB, Beltrão EIC. Comparative lectin binding of the egg-granuloma system in experimental and human schistosomiasis. In: VI Reunião Regional Nordeste SBBq, Fortaleza, 2002.

19-Haba S, Hamaoka T, Takatsu K, Kitagawa M. Selective suppression of T-cell activity in tumor-bearing mice and its improvement by lentinan, a potent antitumor polysaccharide. *Int. J. Cancer* 18: 93-104, 1976.

20-Hamuro J, Chihara G. Lentinan, a T-cell oriented immunopotentiator: its experimental and clinical application, and possible mechanism of immune modulation. In: FENICHEL, R. L., CHIRIGOS, M. A. (eds) *Immune modulation agents and their mechanisms*. New York: Marcel Dekker, 409-436, 1985.

21-Hamuro J, Rollinghoff N, Wagner H. β -(1 \rightarrow 3)-glucan-mediated augmentation of alloreactive murine cytotoxic T-lymphocytes *in vivo*. *Cancer Research* 38: 3080-3085, 1978.

22-Katz NA. simple device for quantitative determination of *Schistosoma mansoni* eggs in faeces examined by the thick-smear technique. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 14: 397-400, 1972.

23-Kennedy JF, Palva P G, Corella MTS, Cavalcanti MSM, Coelho LCBB. Lectins, versatile proteins of recognition – a review. *Carbohydrate Polymers* 26: 219-230,1995.

24-Killion JJ, Fidler IJ. Therapy of cancer metastasis by tumoricidal activation of tissue macrophages using liposome-encapsulated immunomodulators. *Pharmacology Therapy* 78: 141-154,1998.

25-Ladányi A, Tímár J, Lapis K. Effect of lentinen on macrophage cytotoxicity against metastatic tumor cells. *Cancer Immunology and Immunotherapy* 36: 123-126, 1993.

26-Maquart FX, Bellon G, Gillery P, Wegrowski Y.,Borel JP. Stimulation of collagen synthesis in fibroblast cultures by a triterpene extracted from *Centella asiatica*. *Connect Tissue Res* 24: 107– 20, 1990.

27-Maquart FX, Chastang F, Simeon A, Birembaut P, Gillery P. Triterpenes from *Centella asiatica* stimulate extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds. *European Journal of Dermatology* 9: 289–96, 1999.

28-Mccarthy J, Nutman T. Perspective: prospects for development of vaccines against human helminthic infections. *Journal of Infection and Disease* 174: 1384-1390, 1996.

29-Miceno AM. Isolamento e caracterização de α -D-glucana e D-galactomanana do líquen *Ramalina ecklonii* (Spreng.) Mey and Flot, Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 1988.

30-Nyame AK, Leppanen AM, Bogitsh BJ, Cummings RD. Antibody responses to the fucosylated laccinac glycan antigen in *Schistosoma mansoni*-infected mice and expression of the glycan among Schistosomes. *Experimental Parasitology* 96: 202-212, 2000.

31-O'Neill AN. Sulphated derivatives of laminarin. *Can. J. Chem.* 33: 1097-1101, 1955.

32-Pontes ACO, Caetano MN, Santos-Magalhães NS. Physico-chemical characterization and antimicrobial activity of benzathine penicillin G liposomes. *STP. Pharm. Sci.* 9: 419-427, 1999.

33-Smolinski AT, Pestka J.J. Modulation of lipopolysaccharide-induced proinflammatory cytokine production in vitro and in vivo by the herbal constituents apigenin(chamomile), ginsenoside Rb1 (ginseng) and parthenolide (feverfew). *Food and Chemical Toxicology* 41: 1381–1390, 2003.

34-Souza-Araújo FV; Melo-Júnior MR; Araújo RVS.; Cavalcanti CBL.; Carvalho-Júnior LB.; Iacomini M; Santos-Magalhães NS.; Carneiro-Leão AMA. Distinct lectin-binding sites in hepatic granuloma of mice treated with polysaccharide extracted from *Anacardium*

occidentale gum. In: XXXII Reunião Anual Da Sociedade Brasileira De Bioquímica E Biologia Molecular, Caxambu p. 99, 2003.

35-Stuelp, PM. Atividade anti-coagulante de α - e β -D-glucanas extraídas do líquen *Ramalina celastri* modificadas quimicamente, Tese de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, 1997.

36-Stuelp-Campelo P.M, Leão AMAC, Gorin PAJ, Iacomini M. The glucans of *Ramalina celastri* : relation with chemotypes of other lichens. Carbohydrate Polymers 40: 101-106, 1999.

37-Stuelp-Campelo PA, Oliveira MBM, Carneiro-Leão AMA, Carbonero ER, Gorin PAJ, Iacomini M. Effect of a soluble α -D-glucan from the lichenized fungus *Ramalina celastri* on macrophage activity. International Immunopharmacology 2: 691-698, 2002.

38-Szoka F, Papahadjopoulos D. Liposomes: preparation and characterization. In: KNIGHT, C. G., ed. **Liposomes**: from physical structure to therapeutic applications. Amsterdam: Elsevier, 51-82, 1981.

39-Torchilin VP, Levchenko TS, Lukyanov AN, Khaw BA, Klibanov AL, Rammohan R, Samokhin GP, Whiteman KP. p-nitrophenylcarbonily-PEG-PE-liposomes: fast and simple attachment of specific ligands, including monoclonal antibodies, to distal ends of PEG chains via p- nitrophenylcarbonily groups. Biochemic and Biophysic Acta 1511: 197-411, 2001.

40-Vieira S. Introdução à bioestatística. Rio de Janeiro, 1981.

41-Widgerow AD, Chait LA, Stals R, Stals PJ. New innovations in scar management. Aesthet Plast Surg 24: 227– 34, 2000.

42-Wroblewski S, Berenson M, Kopekova P, Koppek J. Potential of lectin-N-(2-hidroxypropyl) methacrylamide copolymer-drug conjugates for the treatment of pre-cancerous conditions. *Journal controlled release* 74: 283-293, 2001.

43-Zachabitz JD. Glycoconjugate expression and cartilage development of the cranial skeleton. *Acta tropica* 161: 254-274, 1998.

44-Zanotti-Magalhães EM, Magalhães LA, Carvalho JF. Relationship between the pathogenicity of *Schistosoma mansoni* in mice and the susceptibility of the vector mollusc. II. Number of eggs in the feces and number and size of granulomas in the viscera. *Revista de Saúde Pública* 27: 412-420, 1993.