



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

RISOLETA NOGUEIRA SOARES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DA
 β -LAPACHONA EM CICLODEXTRINA FRENTE AO *Schistosoma mansoni***

RECIFE, 2016

RISOLETA NOGUEIRA SOARES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DA
 β -LAPACHONA EM CICLODEXTRINA FRENTE AO *Schistosoma mansoni***

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pelo programa de Pós- Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco.

**Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Mônica
Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
Co-orientador: Prof. Dr. André de Lima Aires**

RECIFE, 2016

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S676a Soares, Risoleta Nogueira.
Avaliação da atividade do complexo de inclusão da β lapachona em ciclodextrina frente ao *Schistosoma mansoni* / Risoleta Nogueira Soares.
– 2016.
90 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2016.
Inclui referências.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Naftoquinonas. 3. Ciclodextrinas. 4. Granuloma. I. Albuquerque, Mônica Camelo Pessoa de Azevedo (Orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-010)

RISOLETA NOGUEIRA SOARES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO COMPLEXO DE INCLUSÃO DA
β-LAPACHONA EM CICLODEXTRINA FRENTE AO *Schistosoma mansoni***

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em Ciências
Farmacêuticas pelo programa de Pós- Graduação
em Ciências Farmacêuticas da Universidade
Federal de Pernambuco.

Aprovada em: 22 de setembro de 2016

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Maria do Carmo Alves de Lima (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

REITOR:

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR:

Prof. Silvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof^a. Dra. Florisbela de Arruda Camara e Siqueira Campos

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof^a. Dra. Vânia Pinheiro Ramos

CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Antônio Rodolfo de Faria

VICE-CHEFE DO DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof^a. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Almir Goncalves Wanderley

VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes

Dedico a minha amada mãe, Hilda Nogueira de Lima Soares, por todas as vezes que me corrigiu, fazendo com que me tornasse uma pessoa descente. Pelo carinho e dedicação, por acreditar no meu potencial e por ter assumido o papel de pai e mãe quando foi necessário.

Ao meu amado pai, José Soares da Silva (em memória), que partiu precocemente sem presenciar minhas conquistas, tenho certeza de que hoje ele derramaria uma lágrima de orgulho e felicidade.

Ao meu avô José Nogueira de Melo (em memória) por ter sido a mais bela referência masculina que uma mulher pode ter. A minha avó Maria Luiza de Lima Melo por ser sempre tão preocupada com sua família, por todas as vezes que me ajudou e se fez presente. E a minha avó Severina Correia por marcar minha infância com boas lembranças.

As minhas Irmãs, Elza Cristina Nogueira Soares e Raphaela Nogueira Soares Lopes, pela amizade, preocupação e pelos sobrinhos que me deram. Aliás, também devo dedicar a eles por toda a diversão que me proporcionam e pelo carinho que têm por Titia Leleta.

Também dedico aos meus cunhados João Nelson Gomes Santana e Rodrigo Sérgio Lopes Pereira, tios e tias, primos e primas.

Dedico aos meus amigos e amigas que, por vezes, fazem papel de irmãos.

Ao meu atencioso namorado, Rafael Conde Ferreira Farias, por sua dedicação, paciência e companheirismo. Por encher minha vida com momentos únicos e indescritíveis.

Por fim, dedico às pessoas acometidas por doenças negligenciadas, as quais são vítimas do descaso político, social e do capitalismo que impregna as indústrias farmacêuticas.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus por me fazer forte e guiar-me pelos melhores caminhos.

Agradeço a Universidade Federal de Pernambuco- UFPE por todas as vivências que ela proporciona aos seus alunos.

Agradeço a minha orientadora Mônica Camelo Pessoa de Azevedo pela oportunidade, orientação, colaboração e ensinamentos, bem como ao meu coorientador André de Lima Aires.

Agradeço aos integrantes do laboratório de Imunologia do LIKA, em especial a Luana Maria Mariz Gomes da Silva, Antônio Sérgio Alves de Almeida e Victor Hugo Barbosa dos Santos pela ajuda e, principalmente, pela amizade construída. Aos ICs Daniel Francisco Pereira Junior, Eliana Domingues Nunes, Clênio Silva da Cruz e Renan Andrade Fernandes de Souza pela ajuda. Vocês são essenciais para o andamento dos projetos de pesquisa.

Agradeço aos funcionários do biotério do LIKA e, ainda, aos integrantes do laboratório de microscopia.

Aos professores Jacinto da Costa Silva Neto e Jaymesson Raphael Cardoso Vieira por cederem seus laboratórios.

Ao Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos-LTM por ceder a β -lapachona complexada à M β CD.

Agradeço à Prof.^a Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes, à Prof.^a Maria do Carmo Alves de Lima Eulália, ao Prof. Jamerson Ferreira de Oliveira e à Prof.^a Francisca Janaína Soares Rocha por aceitarem compor a banca avaliadora deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas-PPGCF, ao seu corpo docente - pela contribuição intelectual - e demais funcionários, em especial a Nerilin Trajano por sua disposição em ajudar os pós-graduandos.

Por fim, agradeço ao CNPq, a CAPES e a FACEPE pelo financiamento deste projeto de pesquisa.

RESUMO

A 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-*b*] pirano-5,6-diona ou β -lapachona (β -lap) destaca-se dentre as naftoquinonas devido às suas numerosas propriedades biológicas, principalmente no que diz respeito ao seu potencial anticâncer. Entretanto, sua limitada solubilidade em meio aquoso é um obstáculo a ser transposto para que a mesma torne-se um fármaco aplicável à terapêutica. Objetivando amplificar a solubilidade de moléculas lipossolúveis a tecnologia farmacêutica faz uso de múltiplos recursos, entre eles a complexação em ciclodextrinas (CDs), oligossacarídeos cíclicos capazes de solubilizar em meio aquoso moléculas orgânicas praticamente insolúveis. Estudos preexistentes apontam que β -lap apresenta potencial esquistossomicida: impedindo a penetração de cercarias na pele; inibindo a glicólise aeróbica e alterando a motilidade de vermes adultos; causando descamação, bolhas e ruptura do tegumento. Estima-se que 250 milhões de pessoas distribuídas em 78 países e territórios estejam infectadas pelo schistosoma em todo o mundo. O surgimento de cepas resistentes ou tolerantes ao praziquantel (PZQ), bem como a sugestiva atuação esquistossomicida da β -lap, nos impeliram a avaliar a atuação *in vivo* desta naftoquinona complexada em 2-O-metil- β -ciclodextrina (M β CD) sobre o *S. mansoni* (modelo murino). Os camundongos foram infectados com 50 cercarias (cepa BH), posteriormente tratados com β -lap:M β CD por via oral com 50 mg/kg/dia ou 100mg/kg/dia por 5 dias consecutivos, iniciando-se a terapia no 1° (esquistossômulo de pele), 14° (esquistossômulo pulmonar), 28° (vermes jovens) e 45° (vermes adultos) dia pós-infecção. Também foi formado um grupo controle não tratado, controle M β CD e um grupo PZQ. Todos os animais foram eutanaziados no 55° dia pós-infecção. A análise estatística foi realizada com auxílio do GraphPad Prism 6.0., utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA, através da análise de variância (Tukey). Os dados foram expressos como a média $\pm$ DP. Em todos os casos, os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$. β -lap:M β CD causou redução significativa no número de vermes em comparação ao grupo controle: 33,56%, 35,7%, 35,45% e 36,45%, quando a dose administrada foi 50mg/kg/dia, e 65,00%, 60,342%, 52,721% e 65,007%, quando a dose administrada foi 100mg/kg/dia, no 1°, 14°, 28° e 45°, respectivamente. Nessa mesma fase evolutiva ainda foi possível observar redução percentual significativa no número de ovos imaturos e aumento no número de ovos maduros e mortos. Nossos dados mostram que complexar β -lap em M β CD incrementou sua solubilidade, absorção e biodisponibilidade oral, resultando na atividade esquistossomicida encontrada neste estudo. β -lap inibe a oviposição e, consequentemente, reduz os danos causados pelos antígenos do ovo ao tecido do hospedeiro. Ainda atribuímos a redução do volume médio dos granulomas ao potencial imunomodulador de β -lap. Este trabalho servirá como precedente para que futuras pesquisas sejam feitas com novas formulações alternativas, bem como estudos que visem delinear os mecanismos de ação da β -lap. Além disso, também oferece a possibilidade de que esta naftoquinona torne-se um protótipo para novos fármacos esquistossomicidas aplicáveis à terapêutica.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Naftoquinonas. Ciclodextrinas. Granuloma.

ABSTRACT

The 3,4-dihydro-2,2-dimethyl-2H-naphthol[1,2-b]pyran-5,6-dione or β -lapachone (β -lap) stands out among the naphthoquinones due to its numerous biological properties, especially with regard to its potential anticancer. However, its limited solubility in water is an obstacle to be overcome for it to become an applicable therapeutic drug. Aiming to amplify the solubility of liposoluble molecules, pharmaceutical technology makes use of multiple resources, including complexation in cyclodextrins (CDs), cyclic oligosaccharides capable of solubilizing in water practically insoluble organic molecules. Previous studies show that β -lap displays schistosomicidal activity: preventing the penetration of cercariae into skin; inhibiting aerobic glycolysis; changing the motility of adult worms; and causing flaking, blistering and rupture of the integument. It is estimated that 250 million people distributed in 78 countries and territories are infected with schistosoma worldwide. The emergence of resistant strains or tolerant praziquantel (PZQ) and suggestive schistosomicidal activity of β -lap, impelled us to evaluate in vivo performance of this naphthoquinone complexed in 2-O-methyl- β -cyclodextrin (M β CD) on *S. mansoni* (mouse model). Mice were infected with 50 cercariae (BH strain), subsequently treated with β -lap: M β CD orally with 50 mg/kg/day or 100mg/kg/day for 5 consecutive days, starting the treatment on the 1^o (schistosomulum skin), 14^o (lung schistosomulum), 28^o (juvenile worms) and 45^o (adult worms) day post-infection. It was also formed an untreated control group, M β CD control and a PZQ group. All animals were euthanized the 55th day post-infection. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 6.0., using the nonparametric One-way ANOVA by analysis of variance (Tukey). Data were expressed as mean $\pm$ SD. In all cases, the results were considered significant when $p < 0.05$. β -lap: M β CD caused a significant reduction in the number of worms: 33.56%, 35.7%, 35.45% and 36.45% when the dose was 50mg/kg/day, and 65.00%, 60.342%, 52.721% and 65.007%, when the dose was 100 mg/kg/day, 1^o, 14^o, 28^o and 45^o, respectively. In this same evolutionary stage it was still possible to observe significant percentage reduction in the number of immature eggs and increase the number of mature eggs and dead. Our data show that complex β -lap in M β CD increased the solubility, absorption and oral bioavailability, resulting schistosomicidal activity found in this study. β -lap inhibits oviposition and hence reduces the damage caused by egg antigens to the host tissue. We still attribute the reduction in the average volume of granulomas to immunomodulatory potential of β -lap. This work will serve as a precedent for future research are made with new alternative formulations, as well as studies aimed at delineating the mechanisms of action of β -lap. It also offers the possibility that this naphthoquinone become a new prototype schistosomicidal drugs applicable to therapy.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. Naphthoquinones. Cyclodextrins. Granuloma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Distribuição da esquistossomose no mundo de acordo com seus índices de prevalência.

Figura 2 - Distribuição da esquistossomose no Brasil, de acordo com a faixa de positividade, por município.

Figura 3 - Distribuição geográfica dos municípios prioritários para esquistossomose em Pernambuco. Municípios com IP $\geq 10\%$ por no mínimo dois anos, entre 2010-2014.

Figura 4 - Formas evolutivas do *S. mansoni*.

Figura 5 - Morfologia da concha de *Biomphalaria glabrata* em três ângulos distintos. Hospedeiro intermediário do *Shistosoma mansoni*.

Figura 6 - Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*.

Figura 7 - Achados clínicos característicos da esquistossomose mansônica.

Figura 8 - Estrutura química do Praziquantel.

Figura 9 - Estrutura química do lapachol e da β -lapachona, respectivamente.

Figura 10 - Ipê Roxo e Branco.

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

Figura 12 - Esquematização simplificada do ciclo redox das quinonas.

Figura 13 - Estrutura tronco-cônica da β -CD evidenciando as hidroxilas primárias e secundárias.

Figura 14 - Estrutura das principais ciclodextrinas naturais.

Figura 15 - Eletromicrografias de MEV da β -lapachona e M β CD, mistura física e complexo formado.

Figura 16 - Esquema de formação dos grupos experimentais.

Tabela 1 - Efeitos da β -lapachona complexada a 2-O-metil- β -ciclodextrina sobre a carga de vermes, ovos no tecido hepático e número médio de granulomas em camundongos albergando diferentes estágios de desenvolvimento do *S. mansoni*, eutanaziados no 55º dia pós-infecção.

Figura 17- Gráfico da percentagem de ovos imaturos, maduros e mortos do *S. mansoni* a partir da análise do oograma.

Figura 18. Gráfico do volume médio dos granulomas hepáticos encontrados nos sub-grupos tratados no 45º dia pós-infecção com MβCD, β-lap:MβCD (50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia) e PZQ.

Figura 19 - Fotomicrografias de secções do tecido hepático de camundongos infectados à 55 dias com *Schistosoma mansoni* e corados com hematoxilina-eosina (HE): não tratados (A-C); tratados com β-lap:MβCD 50mg/kg/dia (D e G) e 100mg/kg/dia (E e H); tratados com PZQ 50mg/kg/dia (F e I). Imagem capturadas com auxílio do Microscópio Axio. Image.M2m

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>B. glabrata</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>
BH	Belo Horizonte
Ca ²⁺	Íon cálcio
CAT	Enzima Catalase
CD	Ciclodextrina
CGTase	Enzima ciclodextrina-glicosil-transferase
COX-1	Enzima ciclooxigenase-1
COX-2	Enzima ciclooxigenase-2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
DS	Densidade
EROS	espécies reativas de oxigênio-
<i>et al.</i>	E outros
FAD	Enzima flavina
Fe ⁺²	Íon ferroso
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina/eosina
HPβCD	Hidroxi-propil- β-CD
HPγCD	Hidroxi-propil-γ-CD
IgE-	Imunoglobulina E
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-13	Interleucina 13
IP	Índice de Positividade
KCl	Cloreto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LTM	Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos
MS	Ministério da Saúde
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MβCD	Metil-β-ciclodextrina

MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
Min	Minuto
MM	Massa Molar
O ₂	Oxigênio molecular
O ₂ •	Radical superóxido
OH ⁻	Hidroxila
pH	Potencial hidrogeniônico
Q• ⁻	Semiquinona
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
SANAR	Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas
SBβCD	Sulfo-butil-éter-β –CD
SOD	Enzima superóxido dismutase
SEA	<i>Soluble egg antigens</i>
<i>S. haematobium</i>	<i>Schistosoma haematobium</i>
<i>S. intercalatum</i>	<i>Schistosoma intercalatum</i>
<i>S. japonicum</i>	<i>Schistosoma japonicum</i>
<i>S. mansoni</i>	<i>Schistosoma mansoni</i>
TNF-α	Fator de necrose tumoral
TOP I	Topoisomerase I
TOP II	Topoisomerase II
RMβCD	Metil-β-CD randomizada
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
WHO	World Health Organization
α-CD	α-ciclodextrina
β-CD	β-ciclodextrina
β-lap	β-lapachona
γ-CD	γ-ciclodextrina

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
Cm	Centímetro
G	Grama
Kg	Quilograma
Mg	Miligrama
mg/Kg/ dia	Miligrama por quilograma por dia
mol	Quantidade de matéria
n°	Número
$T_{\max}$	Tempo máximo
$t^{1/2}$	Tempo de meia-vida
α	Alfa
B	Beta
γ	Gama
μm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA	19
2.1.1 Epidemiologia e distribuição geográfica da esquistossomose.....	19
2.1.2 Formas evolutivas e ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	22
2.1.3 Patogenia	26
2.1.4 Tratamento	29
2.2 β - LAPACHONA.....	32
2.2.1 Obtenção e propriedades físico-químicas da β -lapachona.	33
2.2.2 Mecanismo de ação da β -lapachona.....	36
2.2.3 Propriedades biológicas da β -lapachona	38
2.3 CICLODEXTRINAS	39
2.3.1 Estrutura e síntese das ciclodextrinas.....	40
2.3.2 Ciclodextrinas naturais e sintéticas.	41
2.3.3 Complexo de inclusão β -lapachona em 2-O-metil- β -ciclodextrina.....	43
3 OBJETIVOS.....	45
3.1 OBJETIVO GERAL	45
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	45
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	46
4.1 ANIMAIS.....	46
4.2 MANUTENÇÃO DA CEPA DE <i>Schistosoma mansoni</i> : INFECÇÃO DE CARAMUJOS, OBTENÇÃO DAS CERCÁRIAS E INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS.	46
4.3 COMPOSTOS.....	47
4.4 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO	47
4.4.1 Parâmetros parasitológicos.....	48
4.4.2 Estudo histopatológico e histomorfometria do tecido hepático – Técnica de Cheever	49
4.4.3 Critérios de interpretação dos resultados.....	50
4.4.4 Análise estatística.....	51
5 RESULTADO	52
5.1 EFEITO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO β -lap:M β CD EM DIFERENTES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DO <i>S. mansoni</i>	52

5.2 EFEITO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO β -lap:M β CD SOBRE O GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO.	55
6 DISCUSSÃO.....	59
6.1 EFEITO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO β -lap:M β CD EM DIFERENTES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DO <i>S. mansoni</i>	59
6.2 EFEITOS DO COMPLEXO DE INCLUSÃO β -lap:M β CD SOBRE O GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTIVO: ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICA E CONTAGEM DE GRANULOMAS.....	64
7 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS:	70

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, mais de 250 milhões de pessoas no mundo encontram-se infectadas por parasitos do *Schistosoma* e, aproximadamente, 800 milhões vivem em áreas de risco para a infecção, distribuídas entre 78 países e territórios subdesenvolvidos ou em processo de desenvolvimento social, econômico e cultural (WHO, 2014). O Brasil ainda faz parte do grupo de países que apresentam parte significativa da população acometida pela esquistossomose. O *Schistosoma mansoni* é a espécie predominante no país. A região Nordeste apresenta a maior prevalência para essa parasitose, sendo Pernambuco o estado nordestino com maior número de notificações para a doença, englobando 103 municípios endêmicos (PERNAMBUCO, 2014; WHO, 2014).

O praziquantel (PZQ) é o único fármaco eficaz contra todas as espécies do *Schistosoma*, possui elevada taxa de cura, apresenta baixa toxicidade e baixo custo (DOENHOFF *et al.*, 2008); desse modo, a WHO preconiza seu uso como medicamento de escolha para o tratamento da esquistossomose (WHO, 1993; 2014). Entretanto, Fallon e Doenhoff (1994), Abdul Ghani *et al.* (2009), Couto *et al.* (2011) e Búbula (2014) mostram em seus trabalhos o aparecimento de cepas resistentes ou tolerantes, apontando a necessidade do advento de novos fármacos que possam prevenir, tratar e erradicar essa parasitose.

O potencial esquistossomicida das naftoquinonas vem atraindo a atenção de diversos grupos de pesquisa, os quais mostram por meio de suas publicações que esses compostos demonstram atividade *in vitro* e *in vivo* sobre o *S. mansoni* (EDINGL, TERSAN, WAITE, 1947; LORSUWANNARAT *et al.*, 2013; AIRES *et al.*, 2013; 2014; MAGALHÃES *et al.*, 2014).

A β -lapachona (β -lap) é uma molécula cada vez mais estudada no meio científico, sendo uma forte candidata a novo fármaco. Trata-se de uma naftoquinona com potencial terapêutico explorado em diversos estudos. Muitos deles, inclusive, enfatizam seu potencial anticâncer e como agente anti-inflamatório (PARK *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2006; BEY *et al.*, 2007; MOON *et al.*, 2010; SITÔNIO *et al.*, 2012; TSENG, 2013; MOORE, 2015). Além do futuro promissor no tratamento contra o câncer, diversos trabalhos também mostram a atuação da β -lap sobre pandemias modernas como a obesidade, o diabetes e doenças cardiovasculares (DONG *et al.*, 2009; HWANG *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009). Demais estudos ainda apontam sua ação

antibacteriana (DA SILVA, MESQUITA, XIMENES, 2009; COELHO *et al.*, 2010; LOURENÇO *et al.*, 2011; KENNETH *et al.*, 2012), antifúngica (MEDEIROS *et al.*, 2010) e na inibição da replicação do HIV-1 (LI *et al.*, 1993). Também é reportada a β -lap ação sobre o *Trypanosoma cruzi* (MENNA-BARRETO *et al.*, 2007; SALAS *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2011) e atividade antimalárica (ANDRADE-NETO *et al.*, 2004; PÉREZ-SACAU *et al.*, 2005).

A atuação da β -lap no combate a esquistossomose mansônica foi demonstrada por Pinto *et al.*, em 1997, quando os mesmos observaram que a administração tópica de β -lap tem como resultado o bloqueio da penetração das cercarias na pele de camundongos. Lima *et al.* (2002) também mostraram ação cercaricida da β -lap. Além disso, *in vitro* β -lap apresentou atividade sobre vermes adultos do *S. mansoni* quando submetidos à incubação por 24 h (AIRES *et al.*, 2014). Recentemente, demonstrou-se sua atuação *in vivo* sobre diferentes estágios evolutivos do *S. mansoni* (esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens e vermes adultos) (AIRES *et al.*, 2013).

É provável que β -lap seja uma molécula com múltiplos alvos farmacológicos, apesar do seu mecanismo de ação ainda não ter sido claramente elucidado. Porém, há algumas hipóteses sobre seus alvos farmacológicos: é possível que β -lap origine espécies reativas de oxigênio (EROS) e intermediários bioalquilantes, assim como outras naftoquinonas (SILVA *et al.*, 2012); suprima as enzimas topoisomerase I e II (SILVA, FERREIRA, SOUZA, 2003); seja capaz de inibir a COX-2 (LEE 2005 *et al.*; DONG-OH *et al.*, 2007); e bloqueie os canais de Ca^{2+} voltagem dependente, levando à inibição do influxo Ca^{2+} (CAVALCANTE *et al.* 2008). Além disso, o acesso a sua solubilidade é um grande desafio, tendo em vista que se trata de uma molécula de difícil dissolução em meio aquoso (KIM *et al.*, 2015). Aumentar sua solubilidade é extremamente importante para que β -lap venha a se tornar um fármaco, especialmente, presente em formulações orais. Para tanto, a tecnologia farmacêutica oferece recursos, como o uso de ciclodextrinas no incremento da solubilidade de moléculas com baixo potencial de dissolução (SZEJTLI, 1994). O satisfatório resultado da complexação de β -lap em ciclodextrinas foi evidenciado por meio do aumento da solubilidade em solução aquosa, maior biodisponibilidade e, conseqüentemente, ação terapêutica (FREITAS NETO, 2012).

Os avanços tecnológicos e científicos tornam inaceitável que a esquistossomose ainda seja responsável pela morte de milhões de pessoas ao redor do mundo. Fica evidente a urgente necessidade de novas terapias para tratar essa enfermidade. Na busca

de fármacos que possam debelar essa parasitose, esse trabalho se propôs a avaliar a atividade esquistossomicida, *in vivo* (modelo murino), da β -lapachona complexada em 2-*O*-metil- β -ciclodextrina (β -lap:M β CD) sobre *Schistosoma mansoni*. Assim, pretende-se contribuir para o surgimento de um novo fármaco com potencial esquistossomicida e, adicionalmente, subsidiar o surgimento de novas formulações terapêuticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

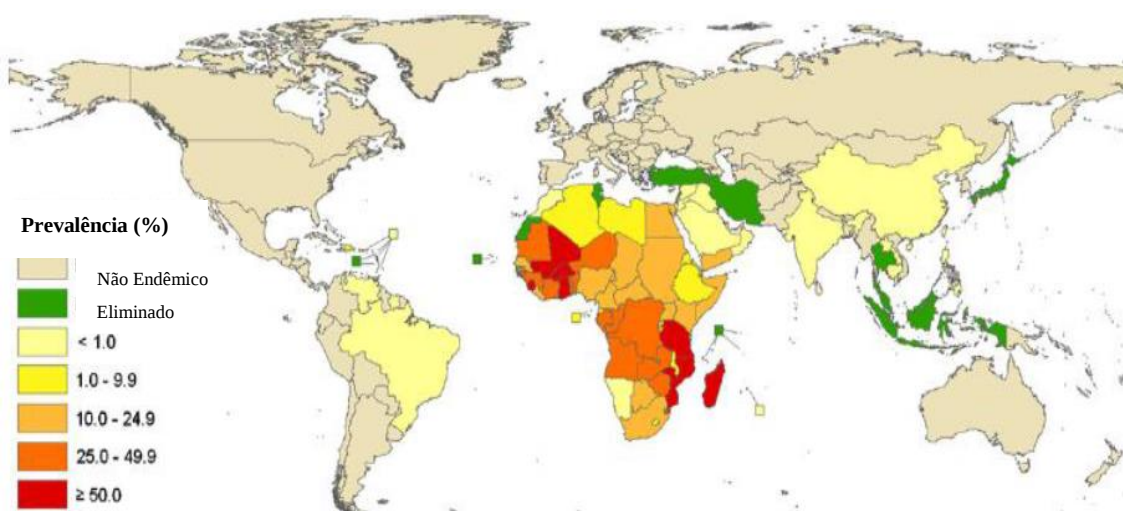
2.1 ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

2.1.1 Epidemiologia e distribuição geográfica da esquistossomose.

A esquistossomose é uma das doenças tropicais negligenciadas mais devastadoras do mundo, sendo a segunda doença infecto-parasitária que mais mata, ficando atrás, apenas, da malária. Estima-se que mais de 250 milhões de pessoas sejam portadoras dessa parasitose, além disso, aproximadamente 800 milhões encontram-se em áreas de risco, distribuídas entre 78 países e territórios com perfis climáticos e socioeconômicos semelhantes, como pode ser visto na Figura 1. (STEINMANN P. *et al.*, 2006; WHO, 2014).

Essa parasitose é prevalente em áreas tropicais e subtropicais, com déficit de água potável e saneamento básico, o que justifica os altos índices de infecção e morte em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento (CHITSULO *et al.*, 2000; STEINMANN *et al.*, 2006). As três principais espécies do *Schistosoma* são o *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma mansoni*, sendo essa última a única espécie prevalente no Brasil. *Schistosoma mekongi*, *Schistosoma guineensis* e *Schistosoma intercalatum* apresentam distribuição epidemiológica limitada e não acometendo faixas territoriais extensas (WHO, 2014).

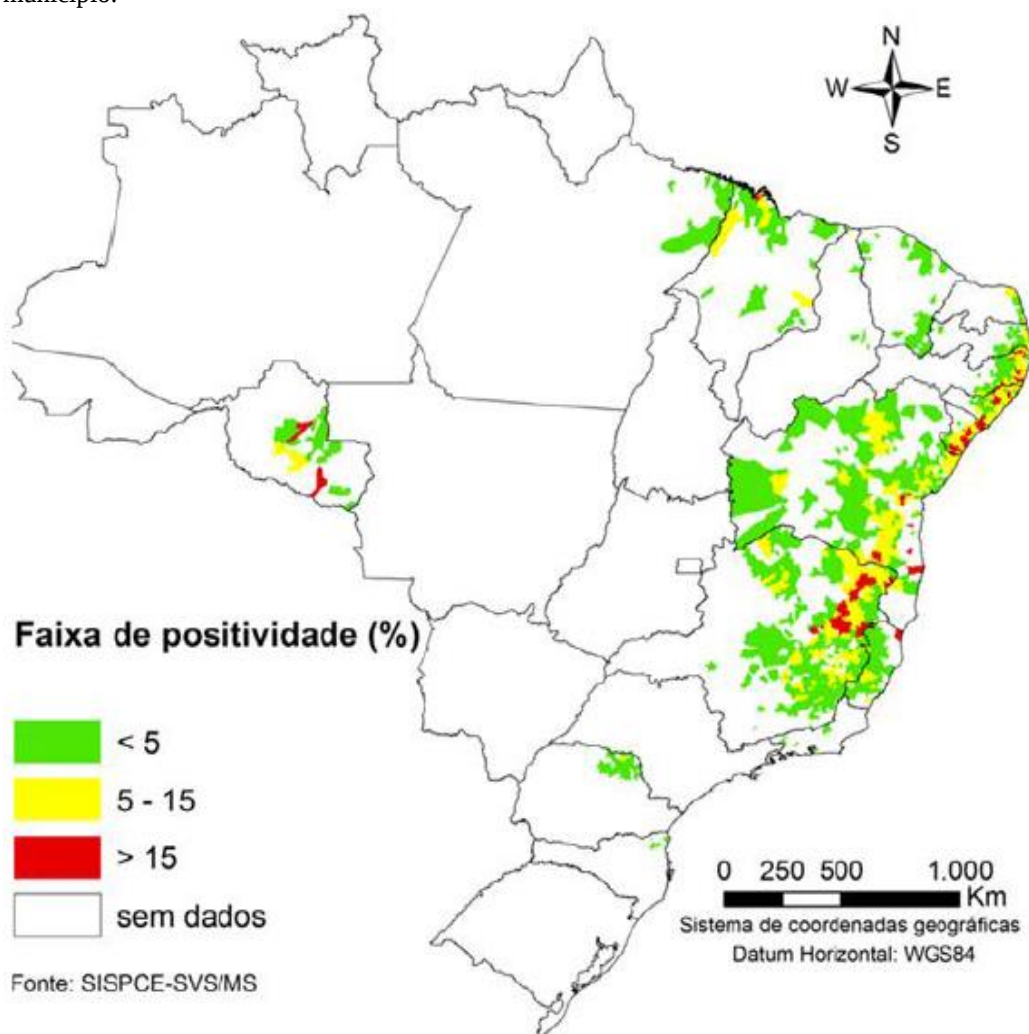
Figura 1 – Distribuição da esquistossomose no mundo de acordo com seus índices de prevalência.



Fonte: Ultzinger *et al.* (2011).

No Brasil, aproximadamente 25 milhões de pessoas vivem em áreas susceptíveis à infecção e 2,5 a 6 milhões estão infectadas (WHO, 2009; BRASIL, 2015). Pontos focais e áreas endêmicas abrangem 18 estados e o Distrito Federal, sendo os estados da região Nordeste e Sudeste os mais afetados (Fig. 2). A ocorrência da doença está diretamente relacionada com presença do molusco transmissor na região (BRASIL, 2014; 2015). Porém, é importante ressaltar que a falta de saneamento básico e educação sanitária são fatores primordiais para a ocorrência da esquistossomose.

Figura 2 - Distribuição da esquistossomose no Brasil, de acordo com a faixa de positividade por município.



Fonte: Brasil (2015).

Entre 2004 e 2013 houve diminuição de 80% na taxa de internações causadas pela esquistossomose mansônica no país. Neste mesmo período foi registrada uma média anual de 431 óbitos (BRASIL, 2015). De acordo com o estudo de Martins Melo *et al.* (2014), no Brasil, entre 2000 e 2011 as taxas mais altas de mortalidade foram oriundas do Nordeste do país. Também foi observado que, apesar da redução da

mortalidade no Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste, a esquistossomose ainda é um grave problema de saúde pública, mesmo havendo meios de prevenção e sendo uma doença tratável.

Com intuito de combater o *S. mansoni*, entre 1975 e 1993, o Programa de Controle da Esquistossomose foi implantado no Brasil, acarretando uma significativa diminuição da prevalência, além de reduzir o aparecimento de formas mais graves da doença (TEIXEIRA, 1990; FAVRE, 2001). Quanto à rastreabilidade, em 25 de janeiro de 2011 foi criada a portaria nº 104 do MS, a qual inclui a esquistossomose na Lista de Notificação Compulsória. Entretanto, acredita-se que nem todos os casos sejam notificados (BRASIL, 2011).

Dentre as unidades federativas brasileiras, Pernambuco é o estado com maior número de notificações para a esquistossomose. Existem 103 municípios de seis Regiões de Saúde endêmicos para a doença. Estes municípios estão concentrados no Litoral, Zona da Mata e parte do Agreste (PERNAMBUCO, 2014). Na Figura 3 estão em destaque os 30 municípios prioritários para o enfrentamento da esquistossomose segundo o Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas – SANAR (PERNAMBUCO, 2013). Novas áreas de transmissão ativa da doença vêm sendo detectadas em localidades próximas às praias e na Região Metropolitana do Recife, porém, faltam dados confirmatórios do aparecimento de formas graves da doença nesses focos (SILVA; DOMINGUES, 2011).

Figura 3 - Mapa do estado de Pernambuco com destaque para os 30 municípios prioritários para o enfrentamento da esquistossomose segundo o Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas – SANAR.



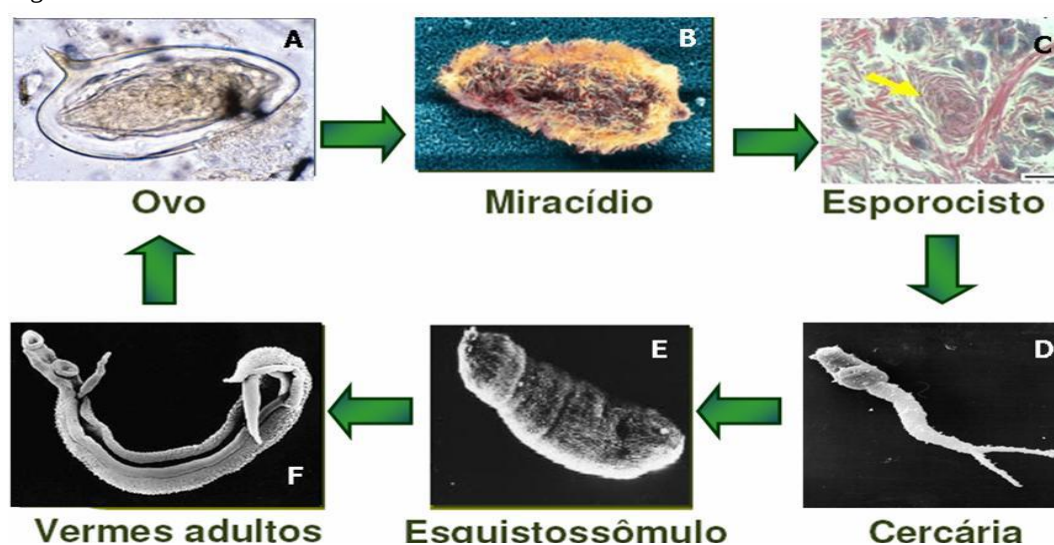
Fonte: Pernambuco (2013).

Pernambuco também representa o estado com maior taxa de mortalidade causada pela esquistossomose, registrando mais de 30% dos óbitos nacionais relacionados a esta parasitose. Segundo dados do SANAR, a prevalência média nas localidades hiperendêmicas, do estado, em 2010 era de 17%, caindo para 4,4% em 2014. Nesse período também houve diminuição de 205 para 175 óbitos por ano. Os dados desse programa ainda mostram redução na positividade da esquistossomose no estado a partir de 2009, possivelmente não só como consequência da implantação do tratamento coletivo nas localidades hiperendêmicas, mas também pela intensificação do tratamento nas unidades de saúde em áreas de baixa a moderada transmissão (PERNAMBUCO, 2014).

2.1.2 Formas evolutivas e ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.

Numerosas e complexas adaptações precisam ser feitas ao longo da vida dos parasitos que apresentam ciclo biológico em habitats extremamente diversos, como a água e o meio interno de seus hospedeiros. Nesse contexto, enquadra-se o *S. mansoni*. O gênero *Schistosoma* é composto por platelmintos trematódeos, dióicos, com ciclo evolutivo heteroxêno, os quais possuem diferentes estágios de desenvolvimento (vermes adultos, ovos, miracídios, esporocistos, cercárias e esquistossômulos). Cada forma exibe características peculiares que permitem a sobrevivência no meio em que habitam (Fig. 4) (SIQUEIRA-BATISTA, 1998; MELO, COELHO, 2005)

Figura 4: Formas evolutivas do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Science Photo Library (2007). A) ovo; B) miracídio; C) Esporocisto; D) Cercária; E) esquistossômulo e F) vermes adultos macho e fêmea.

Hospedeiro Intermediário

Os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* são moluscos hermafroditas pertencentes à família Planorbidae e ao gênero *Biomphalaria*, caracterizados por apresentarem concha enrolada em espiral plana e, por essa razão, conhecidos como planorbídeos (Fig. 5) (LUTZ, 1918). São habitantes de água doce encontrados em barragens, áreas de irrigação, rios, lagos e brejos. Também colonizam habitats temporários em localidades urbanas: canais de drenagem de águas pluviais, valas, terrenos alagadiços e córregos (BARBOSA, 2012).

O gênero *Biomphalaria* possui 37 espécies catalogadas no mundo. No Brasil, são registradas 11 espécies, com destaque para *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria straminea* e *Biomphalaria tenagophila*, espécies envolvidas na disseminação da esquistossomose (PEPE *et al.*, 2006). Ao menos uma dessas três espécies já foi notificada em 25 dos 27 estados brasileiros, sendo o Amapá e Rondônia os estados onde não consta a presença desses moluscos (BRASIL, 2008).

Figura 5: Morfologia da concha de *Biomphalaria glabrata* em três ângulos distintos. Hospedeiro intermediário do *S. mansoni*.



Fonte: Pernambuco (2008).

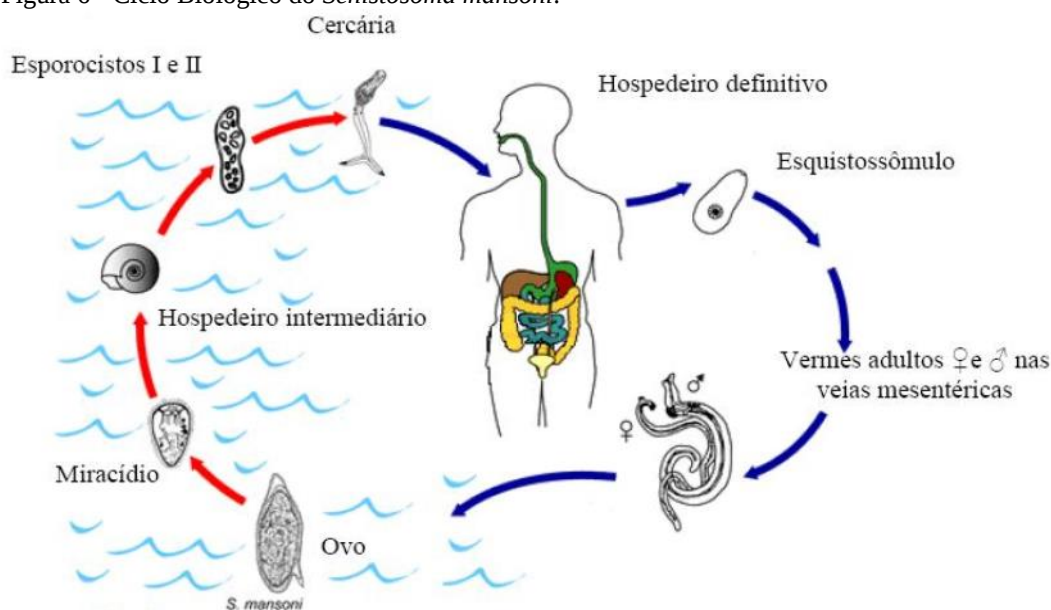
A espécie *B. glabrata* é hospedeiro intermediário mais importante do *S. mansoni* no Brasil e demais países da América. Esse fato se dá em decorrência de sua extensa distribuição geográfica, altos índices de infecção e eficiência na transmissão da esquistossomose (REY, 1993; COUTO, 2005; GUIMARÃES *et al.*, 2007).

Os miracídeos são as formas evolutivas responsáveis por infectar o *B. glabrata* com o *S. mansoni*. Apresentam forma cilíndrica, tendo em média 180µm de comprimento e 64µm de largura. São estruturas ciliadas, o que possibilita a movimentação em meio aquático; além disso, apresentam glândulas adesivas e de penetração que facilitam a infecção do molusco (MELO, COELHO, 2005). Ao penetrar

no *B. glabrata*, os miracídios perdem seus cílios e demais estruturas, restando apenas células envoltas por uma membrana, passando a se chamar esporocisto primário e, posteriormente, por meio de reprodução assexuada originam os esporocistos secundários, os quais migram para as glândulas digestivas do planorbídeo, transformando-se em inúmeras cercárias. Um único miracídio pode dar origem a mais de 100.000 cercárias. A fase no hospedeiro intermediário dura de quatro ou seis semanas (PRATA, 2007; BARBOSA, 2012; GRYSEELS, 2012).

As cercárias tem comprimento corpóreo total aproximado de 500µm, cauda bifurcada medindo 230 por 50µm, apresentam ventosas e glândulas de penetração (MELO, COLEHO, 2005). Saem do caramujo incitadas por estímulos luminosos e de temperatura, comumente nos horários mais quentes e iluminados do dia. A luminosidade é essencial para que o processo ocorra (REY, 2001; RESSURREIÇÃO *et al.*, 2015). Na água, as cercárias nadam por até 72 horas e podem penetrar em variadas membranas, porém só se desenvolverão no hospedeiro definitivo adequado. O homem é o principal hospedeiro definitivo, no qual o parasito chega a sua forma adulta e se reproduz sexuadamente. Outras espécies, como marsupiais (gambá), ruminantes, roedores e lagomorfos (lebres e coelhos), são hospedeiros permissivos ou reservatórios capazes de eliminar ovos nas fezes; porém, ainda não está clara a participação desses animais na transmissão e epidemiologia da doença (SOUZA, LIMA, 1997; GRYSEELS, 2012).

Figura 6 - Ciclo Biológico do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Centro de Controle de Doenças e Prevenção – Esquistossomose.

Hospedeiro Definitivo

As cercárias são responsáveis por infectar o homem com o *S. mansoni*, sendo capazes de penetrar na pele e mucosas do hospedeiro definitivo. Ao atingir a pele do homem, fixam-se com auxílio das duas ventosas, liberam substâncias líticas como hialuronidase, colagenases, entre outras proteases pelas glândulas de penetração e fazem movimentos vibratórios e rotatórios intensos. Quando penetram na pele do hospedeiro, as cercárias perdem a sua cauda bifurcada e o corpo cercariano permanece na derme por dois ou três dias, dando origem aos esquistossômulos de pele. Estes são levados passivamente ao pulmão via coração direito, também há a possibilidade de migração por via linfática e transtissular. No pulmão passam a se chamar esquistossômulos pulmonares (REY, 2001; 2002; LENZI *et al.*, 2008).

Os esquistossômulos pulmonares migram para circulação sistêmica através dos capilares pulmonares e são levados para as veias porta, onde ocorrerá o amadurecimento sexual e a transformação em vermes adultos. No sistema porta hepático, a fêmea acomoda-se no canal ginecóforo do macho e, acasalados, migram para as veias mesentéricas (GRYSEELS, 2012).

Os vermes adultos do *S. mansoni* apresentam dimorfismo sexual evidente. O corpo do macho é dividido em uma região anterior cilíndrica e uma posterior plana, de cor esbranquiçada, medindo cerca de 1 cm. A fêmea apresenta corpo cilíndrico, medindo de 1,2 a 1,6 cm de comprimento, sendo transparente, porém comumente é vista com coloração castanho-escuro oriunda da ingestão de sangue e quebra de hemoglobina em hemozoína no ceco (REY, 2001).

Ao chegarem às veias mesentéricas do plexo hemorroidário superior e, principalmente, inferior, as fêmeas acasaladas iniciam a postura dos ovos. Uma fêmea é capaz de colocar centenas de ovos por dia; cada ovo leva de seis a sete dias para tornar-se maduro quando, finalmente, haverá em seu interior um miracídio formado. Aproximadamente 50% dos ovos alcançam a luz intestinal e são expelidos juntamente com o bolo fecal para o meio ambiente. Caso os ovos não atinjam a luz intestinal, em um período médio de 20 dias após a maturação, os miracídios morrem. Esses ovos podem permanecer encalhados na parede intestinal ou serem arrastados para o fígado. Quando os ovos atingem o meio aquático, em condições adequadas de temperatura, luminosidade e oxigenação da água, eclodem e liberam os miracídios (PESSOA, 1988; MELO, COELHO, 2005; SOUZA, 2011).

Os miracídeos livres na água penetram ativamente no hospedeiro intermediário, o *B. glabrata*. Em seguida, dão continuidade ao ciclo biológico reproduzindo-se assexuadamente. Os miracídeos podem penetrar em moluscos não vetores, girinos entre outras espécies, porém não se desenvolverão (COELHO, 1957; MOURA *et al.*, 2005)

O ciclo biológico do *S. mansoni* encontra-se esquematizado de modo simplificado na Figura 6.

2.1.3 Patogenia

A patogênese da esquistossomose mansônica depende da interação entre o homem e o helminto (CAVALCANTI *et al.*, 1998). A evolução da doença e a sintomatologia estão subordinadas a fatores inerentes ao homem, como o perfil genômico, órgão predominantemente lesado, estado nutricional, etnia, idade, reinfeções, tratamentos específicos, infecções concomitantes associadas, como: o acometimento por *Enterobacteriaceae*; vírus das hepatites B e C, dentre outros; e, principalmente, o perfil imunológico antes e durante a infecção. No que diz respeito ao parasito, são importantes a cepa, a fase evolutiva e a carga parasitária (BUTTERWORTH *et al.*, 1985; LOPES *et al.*, 1998; PEARCE, MACDONALD, 2002; SOUZA, 2011).

As lesões causadas pelo *S. mansoni* ao organismo parasitado são decorrentes tanto da agressão direta do parasito ou de seus elementos, quanto da resposta imune do hospedeiro a tais agressões (PRATA, 1996; KLAVER *et al.*, 2015).

As características patogênicas e o quadro clínico da doença podem ser divididos em duas fases: aguda (inicialmente) e crônica. Esta última pode apresentar-se de três formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (REY, 2001). Na fase aguda o homem pode apresentar uma reação inflamatória (hipersensibilidade) dérmica e subdérmica, mediada por anticorpos IgE, a dermatite cercariana. É a primeira forma de defesa contra a infecção, sendo capaz de destruir importante quantitativo de cercárias e esquistossômulos ainda na pele (LICHTENBERGOVA *et al.*, 2008; VITORINO *et al.*, 2012). As manifestações clínicas são caracterizadas por formações micropapulares, eritematosas e pruriginosas, com intensidade e duração geralmente transitórias (LAMBERTUCCI; SILVA; VOIETA, 2005; ROSS *et al.*, 2007).

À medida que os esquistossômulos migram, adquirem inúmeras proteínas do hospedeiro, como antígenos eritrocitários, imunoglobulinas, antígenos principais de histocompatibilidade de classe I (MHC- classe I) e componente do complemento,

mascarando sua estranheza perante o sistema imunológico (LENZI *et al.*, 2008). Aproximadamente duas semanas após a infecção ocorre o desaparecimento dos sinais cutâneos. Porém, é possível haver aparecimento de febre, mal estar, astenia, urticária, tosse não produtiva, anorexia, náuseas, vômitos, mialgias, cefaleia, diarreia e infiltrados irregulares de eosinófilos visíveis na radiografia pulmonar (DOMINGUES e DOMINGUES, 1994; GRYSEELS *et al.*, 2006; ROSS *et al.*, 2007). Esses sintomas caracterizam outras doenças infecciosas e parasitárias; assim, o quadro clínico não possibilita o fechamento do diagnóstico de infecção por *S. mansoni*.

Os sintomas regredem e a maioria dos pacientes permanece assintomático. Alguns indivíduos desenvolvem manifestações clínicas predominantemente intestinais, caracterizando a forma 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, ALMEIDA, 2003; VITORINO *et al.*, 2012). As manifestações agudas da esquistossomose mansônica são comuns entre indivíduos expostos pela primeira vez à infecção, porém raras em populações de áreas endêmicas (GRYSEELS *et al.*, 2006; ROSS *et al.*, 2007).

Após a maturação no sistema porta hepático, os vermes migram acasalados para as veias mesentéricas, onde ocorre a postura dos ovos. Uma parte dos ovos vai ser lançada para o meio externo juntamente com o bolo fecal; os demais ficarão retidos na mucosa intestinal, serão arrastados para o fígado ou, com menor frequência, para outros órgãos, onde causarão as principais lesões da fase crônica (REY, 2001; HAMS; AVIELLO, FALLON, 2013). Na forma intestinal, a resposta imunológica granulomatosa ao redor dos ovos encalhados na submucosa intestinal leva à microulcerações, sangramento superficial e formação de pseudopólipos. Os sintomas caracterizam-se por dor abdominal crônica ou intermitente, desconforto, falta de apetite e diarreia contendo sangue oculto, o que, muitas vezes, leva o indivíduo infectado a apresentar anemia (ROSS *et al.*, 2007; CARVALHO, 2008; SOUZA, 2011).

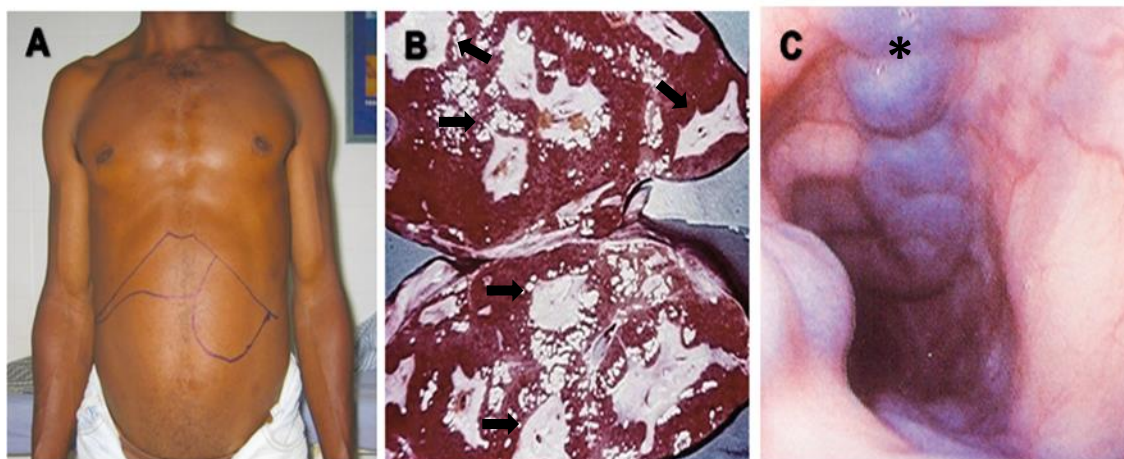
Os ovos arrastados para o fígado dão origem ao quadro mais característico da esquistossomose: a reação inflamatória granulomatosa hepática (REY, 2001). Na fase aguda, mais precisamente no período prepatente, a resposta imune Th1 aparece como perfil imunológico predominante, com aumento de IL-2, TNF- α e INF- γ . Entretanto, no período pós-patente há inversão da resposta imune para o tipo Th2, com secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13. Quando encalham no tecido hepático, os ovos liberam antígenos miracidiais chamados de SEA (*Soluble egg antigens* – Antígenos solúveis do

ovo), os quais levam à liberação de citocinas específicas pró-inflamatórias. Ao longo do processo inflamatório granulomatoso, as células inflamatórias vão sendo substituídas por células semelhantes a fibroblastos, as quais se organizam em camadas concêntricas e fabricam grandes quantidades de colágenos, estimulados, principalmente, pelas citocinas IL-4 e IL-13, características da resposta imunológica Th2 (HANG *et al.*, 1974; WYLER *et al.*, 1978; HAMS, AVIELLO, FALLON, 2013).

Em contrapartida, estudos mostram que a ausência de citocinas da resposta Th2 suprimem a formação do granuloma, levando à forma hepatotóxica da doença e, por conseguinte, à morte (WYNN *et al.*, 1995. FALLON *et al.*, 2000). Em 1997, Brunet e colaboradores mostraram que a deficiência de IL-4 em camundongos infectados com *S. mansoni* levou à não formação do granuloma, o que acarretou uma expressão aguda e letal da doença (BRUNET *et al.*, 1997).

Na fase crônica da infecção os diversos pontos de fibrose podem se unir levando à fibrose periportal, perda da elasticidade e oclusão parcial ou total da luz dos vasos sanguíneos, ocorrendo, assim, um aumento da pressão portal e, conseqüentemente, as alterações patológicas características da fase crônica (Fig.7B). A oclusão da veia porta leva ao desenvolvimento da hipertensão portal, esplenomegalia, ascite (Fig.7A), varizes gastresofágicas (Fig.7C) e sangramento gastrointestinal, os quais que podem ser fatais (DAVIS, KRESINA, 1996; ROSS, 2002; GRYSEELS *et al.*, 2006; BURKE, 2009).

Figura 7: Achados clínicos característicos da esquistossomose mansônica.



Fonte: Lambertucci (2006). A) homem apresentando abdome distendido devido à hepatoesplenomegalia; B) Fígado de humano apresentando fibrose exacerbada evidenciada por setas; C) varizes esofágicas (asterisco).

2.1.4 Tratamento

O tartarato de emetina foi o primeiro quimioterápico a ser usado no tratamento da esquistossomose, em 1918 (CHRISTOPHERSON, 1918). Outras substâncias também surgiram nessa mesma época: o tartarato de potássio e antimônio; seguido pelo dimercaptosuccinato de sódio e antimônio; e o di-(pirocatecol-2,4-dissulfonato) de sódio e antimônio, conhecido como estibofeno; porém, todos apresentavam muitos efeitos colaterais, alta toxicidade (podendo levar a morte), fazendo com que caíssem em desuso (KATZ, COELHO, 2008).

Posteriormente, a lucantona, cloridrato de 1-*N*-b-dietil-amino-etil-amino-4-metil-9-tioxantona foi usada por via oral no tratamento do *S. mansoni* e *S. haematobium*. A hicantona, 1-*N*-b-dietil-aminoetil-amino-4-(hidroximetil)-9-tioxantona) análogo da lucantona, foi empregada por sua eficácia contra o *S. mansoni* e o *S. haematobium*, apesar de apresentar baixa atividade sobre vermes adultos fêmeas e formas evolutivas jovens. O niridazol, 1-(5-nitro-2-tiazolil) imidazolidina-2-ona também foi utilizado no tratamento da esquistossomose, não sendo eficaz contra o *S. mansoni*, mas atuando sobre *S. haematobium* e o *S. japonicum*. Esses fármacos foram descontinuados devido aos seus efeitos colaterais, tais como problemas no sistema cardiovascular e gastrointestinal, lesões hepáticas e renais, psicoses, convulsões, alucinações e outros efeitos danosos ao sistema nervoso central (CIOLI *et al.*, 1995; COLES, 2002; KATZ, COELHO, 2008).

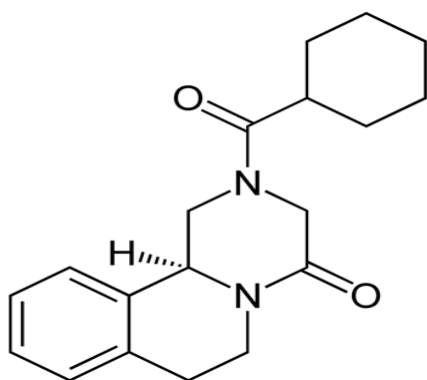
Na década de 70 surgiram a oxamniquina e o praziquantel, fármacos com baixa toxicidade e eficazes no tratamento da esquistossomose. A oxamniquina (Mansil®), (±)-1,2,3,4 – tetraidro- 2-[(isopropilamino)metil]-7-nitro-6-quinolinometanol (PARISE-FILHO *et al.*, 2001) apresenta poucos efeitos colaterais, boa tolerância e índice curativo de aproximadamente 80% para adultos e 70% para crianças com menos de 15 anos, agindo sobre as formas intestinal e hepatoesplênica de infecções causadas pelo *S. mansoni*; porém, é inativa contra *S. japonicum* e *S. haematobium*, restringindo seu uso a determinadas áreas geográficas (TZISIN, BRONSHITIN, 1986; SANTOS, 2006; KATZ, 2008).

Oxamniquina teve sua produção encerrada recentemente devido a sua ação restrita ao *S. mansoni*. O protocolo terapêutico deste fármaco consiste em sua administração oral em dose única (KATZ, 2004). Vermes machos são mais susceptíveis ao fármaco, segundo estudo feito em camundongos infectados pelo *S. mansoni* e tratados com oxamniquina. O mesmo estudo também observou que o tratamento leva à

produção de edema, aparecimento de bolhas e necrose do tegumento (CIMERMAN, 2001). É provável que o mecanismo de ação da oxamniquina esteja relacionado com a inibição irreversível da síntese de ácidos nucléicos dos vermes (CIOLI *et al.*, 1995). Alguns estudos sugerem que a oxamniquina é convertida por uma quinase ou sulfotransferase em éster, o qual seria responsável por alquilar o DNA desse helminto, causando danos irreversíveis (CIOLI, PICA-MATTOCCIA, ARCHER, 1993).

O praziquantel (Cestox®) (Fig.8) é a droga de escolha para o tratamento da esquistossomose, sendo a estratégia de tratamento prioritária em quase todos os países endêmicos para esta parasitose (WHO, 1993; 2014). Apresenta espectro de ação mais amplo que a oxamniquina, age contra todas as espécies de *Schistosoma* que infectam os seres humanos, mantém uma elevada taxa de cura, além de ter baixa toxicidade e baixo custo (CAFFREY, 2007; DOENHOFF *et al.*, 2008). Em 1978, 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). Nesse estudo foi observado que o PZQ é bem tolerado por pacientes de diversas idades, com diferentes formas clínicas da doença (FROHBERG, 1984). Posteriormente, outros estudos apontaram a baixa toxicidade e ausência de potencial mutagênico (FROHBERG, 1984). Trabalhos recentes mostraram a eficácia do PZQ no tratamento em massa de crianças moradoras de áreas endêmicas (COULIBALY *et al.*, 2012; ERKO *et al.*, 2012; GARBA *et al.*, 2012).

Figura 8 – Estrutura química do Praziquantel.



Fonte: Cioli (1998).

Praziquantel apresenta-se como pó branco cristalino com sabor amargo, quimicamente chamado de (±)- 2- ciclo- hexilcarbonil-1, 2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona. A preparação comercial consiste em comprimidos contendo 600mg de PZQ. O composto é estável armazenado em condições normais de

temperatura e umidade. Praticamente insolúvel em água, porém solúvel em alguns solventes orgânicos (DOENHOFF *et al.*, 2008). Apresenta rápida absorção ($T_{\text{máx}}$ 2 à 2,6 horas) com o tempo de meia vida ($t_{1/2}$) entre 2,2 a 8,9 horas. A biodisponibilidade do praziquantel é significativamente aumentada quando administrado concomitantemente com refeições gordurosas (CASTRO, 2000; OLLIARO, 2014).

Apesar das muitas pesquisas feitas, o mecanismo de ação do PZQ ainda não está completamente definido (CIOLI, 2004). No entanto, há indícios que o PZQ atue na subunidade β dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente causando rápido influxo de Ca^{2+} , o que levaria à contração espasmódica do músculo liso e, por fim, à paralisia e morte do verme. O surgimento de bolhas e a vacuolização do tegumento compõem um mecanismo de ação secundária atribuída ao PZQ (JEZIORSKI, GREENBERG, 2006; DOENHOFF *et al.*, 2008; GREENBERG, 2013; 2014). Os efeitos colaterais mais comuns ao PZQ são as dores abdominais, diarreia, náusea, vômito, cinetose, anorexia, cefaleia, tonteados, sonolência, palpitação, prurido, urticária, hiporreflexia, distúrbio visual e tremor (SANTOS *et al.*, 1979; JERNIGAN, PEARSON, 1995).

Ensaios pré-clínicos mostraram que o PZQ é eficaz quando administrado entre a 5ª e 6ª semana após a infecção, entretanto, o tratamento é falho em casos de infecção entre a 1ª a 5ª semana (GONNERT, ANDREWS 1977; XIAO *et al.*, 1985; SABAH *et al.*, 1986). A maior limitação do PZQ no tratamento da esquistossomose é sua baixa eficácia contra as formas evolutivas jovens (GRYSSELS *et al.*, 2001) e vermes fêmeas (PICA-MATTOCIA, CIOLI, 2004).

Ainda que PZQ seja seguro e eficaz, é preocupante que um único medicamento apresente plena eficácia no tratamento de uma doença que afeta milhões de pessoas no mundo, especialmente com o surgimento de cepas do *Schistosoma* pouco sensíveis e/ou resistentes ao PZQ (ABDUL-GHANI *et al.*, 2009). Fallon e Doenhoff (1994) foram os primeiros a mostrar que camundongos submetidos a tratamento com subdoses levaram ao desenvolvimento de cepas de *S. mansoni* resistentes ao PZQ. Ismail *et al.* (1994) também demonstraram que o uso de PZQ em dose subcurativa leva a cepas resistentes. Mais recentemente, Couto *et al.* (2011) mostraram que tratando-se *B. glabrata* infectados com *S. mansoni* é possível induzir resistência ao PZQ em laboratório. Em 2014, Búbula também conseguiu induzir resistência do *S. mansoni* ao PZQ em laboratório.

Além das cepas resistentes ao PZQ induzidas em laboratório, uma susceptibilidade reduzida ao fármaco tem sido amplamente encontrada em muitos focos

endêmicos, em países como o Egito e Senegal (FALLON *et al.*, 1994; ISMAIL *et al.*, 1996; . BONESSO- SABADINI, de SOUZA DIAS, 2002; DANSO – APPIAH, DE VLAS 2002; LAWN *et al.*, 2003; MELMAN *et al.*, 2009). É evidente que falhas no tratamento de indivíduos infectados tornam pertinente o aparecimento de resistência ao PZQ em áreas endêmicas, porém os altos índices de reinfecção podem estar mascarando inúmeros casos de resistência em campo (DOENHOFF, 1998; DANSO-APPIAH, 2002; DOENHOFF, CIOLI, UTZINGER, 2008).

O método ideal para prevenção e erradicação da esquistossomose mansônica seria o surgimento de uma vacina profilática (BERGQUIST *et al.*, 2005). Este fato levou à descoberta de antígenos capazes de induzir proteção contra a infecção, 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). Diante disso, muitos grupos de pesquisa estão estudando estes antígenos e buscando novas possibilidades que corroborem para o surgimento de uma vacina eficaz.

Tendo em vista a ausência de vacinas disponíveis e a ineficácia dos programas de saúde pública, a quimioterapia apresenta-se como único recurso imediato para minimizar a prevalência e incidência da esquistossomose no mundo (CIOLI, PICA-MATTOCCIA, ARCHER, 1995). Além disso, relatos de cepas do *Schistosoma* pouco sensíveis e/ou resistentes ao PZQ deixam clara a necessidade da pesquisa, planejamento e desenvolvimento de novos fármacos capazes de debelar essa parasitose.

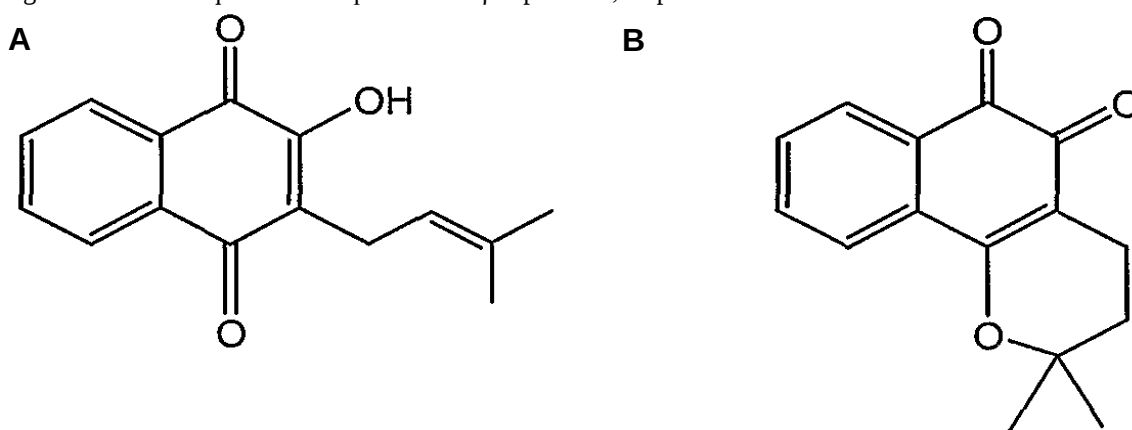
2.2 β - LAPACHONA

As quinonas compõem uma vasta e variada família de metabólitos secundários de ocorrência natural que despertam o interesse dos pesquisadores devido as suas propriedades biológicas e, principalmente, farmacológicas (GROLIG E WAGNER, 2005; FERREIRA, 2010). Diversos estudos destacam o potencial das quinonas: propriedade antimicrobiana (KENNETH, 2012), tripanocida (MENNA-BARRETO *et al.* 2007), antifúngica (MEDEIROS, 2010), leishmanicida (TEIXEIRA *et al.*, 2001) antiviral (SCHUERCH, WEHRLI 1978), antitumoral (MOON *et al.*, 2010; MOORE, 2015), antidepressivo (MOSTERT, 2016), na inibição do reparo celular (SILVA *et al.*, 2003), dentre outras propriedades.

Com base na estrutura molecular, considerando o sistema aromático que sustenta o anel quinonóidico, as quinonas podem ser divididas em três grupos: as benzoquinonas

(um anel benzênico); naftoquinonas (um anel naftalênico); e antraquinonas (um anel antracênico) (SILVA *et al.*, 2003). A β -lapachona (β -lap), 3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-*b*] pirano-5,6-diona (β -lap) é uma orto-naftoquinona que apresenta as carbonilas do anel naftalênico nas posições 1,2 (Fig. 9B) (FERREIRA, 2010). Esta naftoquinona natural foi descoberta em 1882 por Paternò, sendo definida estruturalmente e sintetizada pela primeira vez em 1892 por Hooker. Esse último também foi responsável por definir a estrutura de outra importante naftoquinona, o lapachol (Fig.9A), em 1896 (RAO, 1968).

Figura 9. Estrutura química do lapachol e da β -lapachona, respectivamente.



Fonte: Ferreira *et al.*(2010).

2.2.1 Obtenção e propriedades físico-químicas da β -lapachona.

A β -lap é encontrada como componente minoritário no cerne de espécies de *Tabebuias* (SILVA *et al.*, 2003), como na *Tabebuia avellanedae*, uma Bignoneaceae popularmente conhecida como Ipê Roxo ou Pau d'arco roxo (Fig. 10A) (DO CAMPO *et al.*, 1977).

Figura 10. Ipê Roxo e Branco.

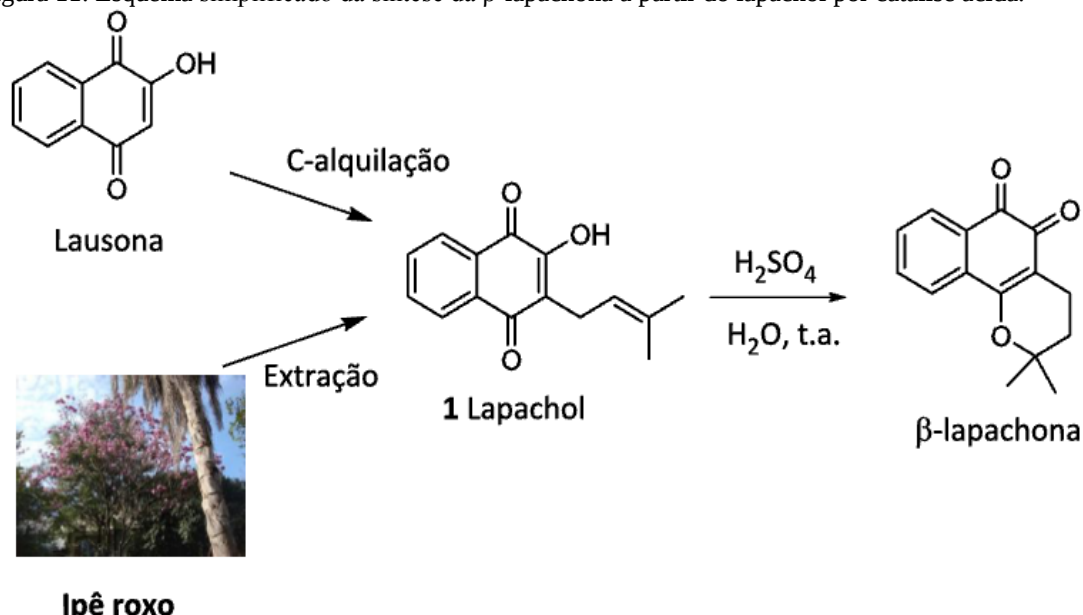


Fonte: Ferreira *et al.*(2010).

Em 1998, Boothman e colaboradores descreveram detalhadamente o processo de semi-síntese da β -lap. Tal processo é descrito como a metodologia mais simples para a síntese da β -lapachona (SILVA *et al.*, 2003).

Em laboratório, a β -lap é sintetizada a partir do lapachol, o qual pode ser naturalmente extraído, ou sintetizado a partir da 2-hidroxi-1,4-naftoquinona (Lausona) (CLAESSENS *et al.*, 2010). Os protocolos comumente empregados para síntese são baseados na ciclização catalítica do lapachol em ácido sulfúrico, havendo um ataque nucleófilo do oxigênio da cadeia lateral isoprenila (Fig. 11). A β -lap é obtida por purificação mediante recristalizações (HOOKER, 1892; 1896). O produto final são cristais aciculares, laranja-avermelhados e visíveis a olho nu (HOOKER 1936; D'ALBUQUERQUE 1968; SUN, GEISER, FRYDMAN, 1998).

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



Fonte: Ferreira *et al.*(2010).

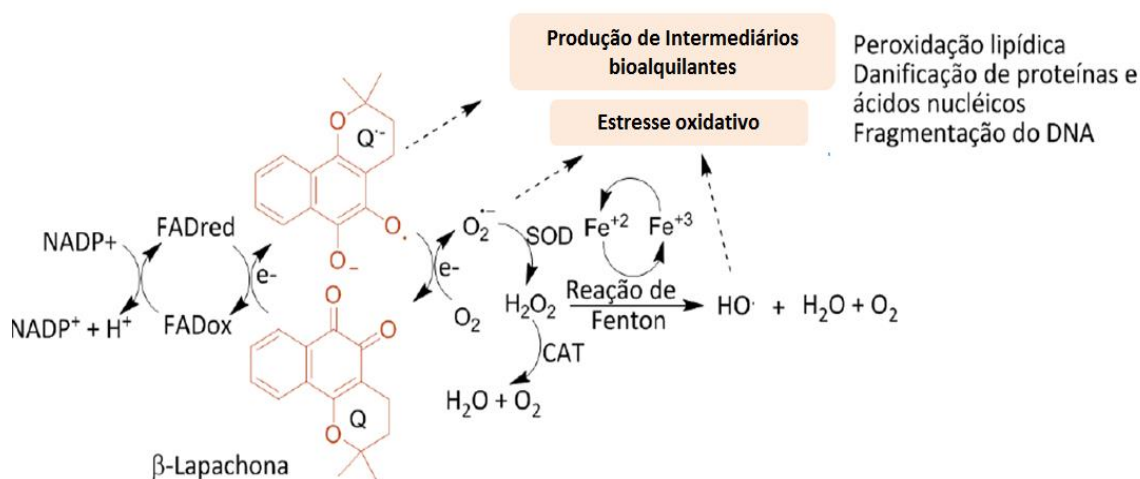
A β -lap apresenta peso molecular de 242,3 g/mol sendo estruturalmente estável em pH variando entre 3 e 9 (SIMÕES *et al.*, 2003). Mostra elevado grau de pureza e baixa solubilidade em meio aquoso (NASONGKLA *et al.*, 2003; FREITAS NETO *et al.*, 2012). A disposição de suas moléculas forma um retículo cristalino rígido bem definido, resultando num alto ponto de fusão e baixa solubilidade, isso porque moléculas com esse tipo de arranjo estrutural apresentam uma superfície de contato bastante reduzida, dificultando sua interação com as moléculas de água (AULTON, 2005; BRANDÃO *et al.*, 2008).

Sua elevada permeabilidade, associada à limitada solubilidade, a classificaria como um fármaco tipo II na classificação Biofarmacêutica (CUNHA FILHO, 2007), implicando, também, na baixa dissolução nos fluidos gastrointestinais, sendo este um ponto crítico, pois, para que ocorra a absorção, distribuição e ação terapêutica de uma substância administrada por via oral, é imprescindível que ela esteja solubilizada (FREITAS NETO, 2012). Kim *et al.* (2015), apontam a baixa solubilidade da β -lap como causa da baixa biodisponibilidade oral encontrada em seu estudo.

2.2.2 Mecanismo de ação da β -lapachona

O mecanismo de ação da β -lap ainda não foi bem definido, porém estudos apontam que β -lap age produzindo espécies reativas de oxigênio- EROS ($O_2^{\bullet-}$, $HO^{\bullet}$, $1O_2$ e H_2O_2), assim como outras quinonas (SILVA *et al.*, 2012). Supõe-se que β -lap sofre redução de um elétron pelas enzimas NADPH-citocromo P450 redutase, citocromo b5 redutase, xantina oxidoreductase e ubiquinona oxidoreductase, resultando numa semiquinona ($Q^{\cdot-}$) *in situ* (SANTOS, 2004). A redução de dois elétrons é catalisada por NADPH/dihidronicotinamidaribosídeo (NRH): quinona oxidoreductase (NQOs), e tem como produto final hidroquinonas relativamente mais estáveis (NIOI, HAYES, 2004). Na presença de oxigênio molecular (O_2), essa semiquinona ($Q^{\cdot-}$) transfere um elétron e produz o radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) sofre a ação da superóxido desmutase, originando o peróxido de hidrogênio (H_2O_2); paralelamente, uma reação de Fenton catalisada por Fe^{+2} resulta na produção do radical hidroxila ($OH^{\cdot}$) (MAKIN, 2001). Os EROS e intermediários bioalquilantes oriundos do ciclo redox das quinonas causam estresse oxidativo celular, peroxidação lipídica, danos às proteínas e ácidos nucleicos, além da fragmentação do DNA (PINTO, CASTRO, 2009; FERREIRA, 2010).

Figura 12. Esquematização simplificada do ciclo redox das quinonas.



Fonte: Adaptado de Ferreira (2010). CAT- Enzima catalase; FAD- Enzima flavina; SOD- Enzima superóxido desmutase.

Lee *et al.* (2005) observaram que β -lap diminui a síntese dos RNAm de ciclooxigenase (COX-2) sem alterações significativas nos níveis de COX-1, além de diminuir a expressão da prostaglandina PGE2 sintetase. Dong-oh *et al.* (2007) também mostraram a inibição da COX-2 em seu estudo, sugerindo o bloqueio a níveis de

transcrição. Além disso, β -lap ainda mostrou-se capaz de atenuar a expressão de RNAm de proteínas e citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- α), de forma dose-dependente, sugerindo seu potencial anti-inflamatório.

Outros estudos sugerem que β -lap é capaz de inibir as topoisomerasas I e II, enzimas cruciais para a replicação, transcrição e reparo do DNA (SILVA, FERREIRA, SOUZA, 2003). A topoisomerase I (TOP I) promove a quebra de uma das fitas de DNA, permitindo o giro da fita quebrada sobre a fita íntegra, de modo que a tensão torcional da molécula sendo transcrita ou replicada é reduzida. Por sua vez, a topoisomerase II (TOP II) complexa-se com o DNA induzindo a quebra das duas fitas, e, posteriormente, ambas as enzimas religam as fitas inicialmente quebradas (EFFERTH, 2007; BRANDÃO, 2010). Estas duas enzimas têm funções recíprocas reversas; assim, uma é expressa quando a outra é inibida (WHITACRE, 1997). Ambas são críticas para o bom funcionamento celular, atacam pontos de unidades tirosínicas do DNA, quebram as ligações fosfodiéster e as refazem quando a tensão na fita é amenizada. Caso haja algum impedimento e as fitas não sejam reconectadas às extremidades livres do DNA, a célula entra em apoptose. Alguns antitumorais existentes no mercado agem impedindo a reconexão das fitas (MANN, 2002; BRANDÃO *et al.*, 2010; CHEN *et al.*, 2013).

Alguns inibidores da TOP I, como as camptotecinas, estabilizam a ligação da enzima à fita de DNA após a clivagem, impedindo a ligação da fita quebrada e induzindo a morte celular. Outros inibidores da TOP não atuam sobre o complexo TOP-DNA, mas, sim, na atividade catalítica da enzima e são chamados de inibidores catalíticos (MATHIJSEN, 2002; POMMIER, 2006; BRANDÃO *et al.*, 2010). Em 1993, Shiang *et al.* demonstraram que o β -lap inibe o relaxamento da molécula de DNA induzido pela TOP I. Neste estudo foi observado que a inibição da TOP I foi significativamente aumentada por pré-tratamento desta enzima com β -lap, antes da adição do substrato de DNA. Este fato sugere que β -lap seja um inibidor catalítico da TOP I, diferentemente da camptotecina.

Em 2008, Cavalcante *et al.* concluíram que β -lap causa espasmos nas células da musculatura lisa do intestino de cobaias por meio da inibição dos canais de Ca^{2+} voltagem dependente. Havendo, assim, inibição da contractilidade da musculatura lisa levando o tecido muscular à paralisia flácida. No estudo, houve inibição das contrações físicas induzidas tanto por carbacol, quanto por histamina. β -lap também foi capaz

relaxar o íleo pré-contraído com KCl, carbacol ou histamina de maneira dependente da concentração. No mesmo estudo, α -lapachona e lapachol também demonstraram efeito espasmolítico.

2.2.3 Propriedades biológicas da β -lapachona

Diversas aplicações terapêuticas são atribuídas a β -lap. Nesse sentido, estudos apontam ação antibacteriana (KENNETH, 2012), antifúngica (MEDEIROS, 2010), antiviral (MÜLLER *et al.*, 1999), antiartrítica (MOON *et al.*, 2007), anti-inflamatória (SITÔNIO *et al.*, 2012; TSENG, 2013), tripanocida (MENNA-BARRETO *et al.*, 2007), esquistossomicida (AIRES, 2013; 2014), na inibição da replicação do vírus HIV (SCHUERCH, WEHRLI, 1978) e contra diferentes linhagens de células neoplásicas (PARK *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2006; MOON *et al.*, 2010; MOORE, 2015). A citotoxicidade sobre células cancerígenas atrai o interesse de muitos pesquisadores e resulta em inúmeras publicações sobre esta atividade. Todo esse potencial torna crescente os estudos sobre os mecanismos de ação da β -lap.

No que diz respeito à atividade da β -lap no combate ao *Schistosoma mansoni*, Pinto *et al.* (1997) demonstraram os efeitos tópicos desta naftoquinona e de alguns de seus derivados no bloqueio da penetração de cercárias em camundongos. A infecção depende de uma penetração plena das cercárias (PINTO *et al.*, 1997). Anteriormente, em 1947, Edingl, Tersan e Waite afirmaram que derivados naftoquinônicos são capazes de inibir a glicólise aeróbica em vermes adultos de *S. mansoni*. Outros estudos apontam atividade moluscicida sobre o *B. glabrata* (hospedeiro intermediário de *S. mansoni*) e seus ovos, além da atividade sobre cercárias (de *S. mansoni*) (LIMA *et al.* 2002, CAMARA *et al.* 2008;).

Em 2013, Aires *et al.* avaliaram em camundongos a atividade esquistossomicida da β -lap 50mg/kg/dia, por via intraperitoneal, sobre os vermes do *Schistosoma mansoni* e observaram uma atividade moderada. Houve diminuição do número de vermes em 29,78%, 37,2 %, 24,2 % e 40,22% quando administrada durante as fases de esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens e vermes adultos, respectivamente. Além disso, em todos os grupos houve diminuição do número e diâmetro dos granulomas hepáticos em relação ao grupo controle. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisa avaliou a atividade da β -lap sobre o tegumento dos vermes do *S. mansoni*. Foi possível observar que em 24h de incubação, a exposição a diferentes

concentrações de β -lap levou à morte de 67% a 100% dos vermes. Também foram observadas alterações na motilidade dos vermes, além da descamação, formação de bolhas e ruptura do tegumento (AIRES *et al.*, 2014).

β -lap também apresenta propriedade anti-inflamatória que corrobora ainda mais para seu uso no tratamento da esquistossomose (LEE *et al.*, 2005; DONG-OH *et al.*, 2007; SITÔNIO *et al.*, 2012; TSENG, 2013), tendo em vista que esta parasitose caracteriza-se como uma doença imunoinflamatória e que as lesões teciduais mais graves são decorrentes da resposta inflamatória contra os antígenos dos ovos.

Considerando os estudos preexistentes sobre β -lap é possível observar que se trata de uma molécula promissora, apesar de sua limitada solubilidade, o que pode ser facilmente revertido por meio do uso de adjuvantes farmacêuticos. Estudos demonstrando suas diversas atividades biológicas e farmacológicas levam a crer que β -lap merece ter seu potencial explorado por meio de estudos mais detalhados, inclusive, com uma abordagem mais ampla do seu potencial antiparasitário. Assim, a necessidade de novos compostos esquistossomicidas atrelada às valorosas características da β -lap impulsionaram esta pesquisa.

2.3 CICLODEXTRINAS

Ao longo dos anos, as ciclodextrinas (CDs) vêm despertando grande interesse da comunidade científica, atraindo a atenção de pesquisadores e indústrias das mais diversas áreas, principalmente do setor farmacêutico (D'SOUZA, LIPKOWITZ, 1998; LYRA *et al.* 2010; dos SANTOS, 2011). As CDs são oligossacarídeos cíclicos formados por unidades de D-glicopirranose (glicose), possuem cavidade interna com caráter hidrofóbico e superfície exterior hidrofílica. Essa característica possibilita que as CDs sejam capazes de hospedar em seu interior uma grande variedade de moléculas, enquanto seu exterior confere solubilidade em meio aquoso (BUHA *et al.*, 2012; BEIG, AGBARIA, DAHAN, 2013)

Em 1891, Villiers observou que a degradação enzimática bacteriana do amido dá origem a oligossacarídeos cíclicos. Posteriormente, Schardinger isolou *Bacillus macerans* produtores da enzima ciclodextrina-glicosil-transferase (CGTase) capazes de sintetizar CDs. Em 1936, Freudenberg postulou sobre a estrutura cíclica das CDs. Até a década de 70 as CDs eram produzidas em baixas proporções e apresentavam alto custo, o que dificultava sua utilização (LOFTSSON, DUCHENE, 2007). Hoje em dia,

as CDs são produzidas a partir de processos biotecnológicos em larga escala e com preços acessíveis, o que vem possibilitando estudos científicos e sua aplicação na indústria (BARRETO, FILHO, 2008).

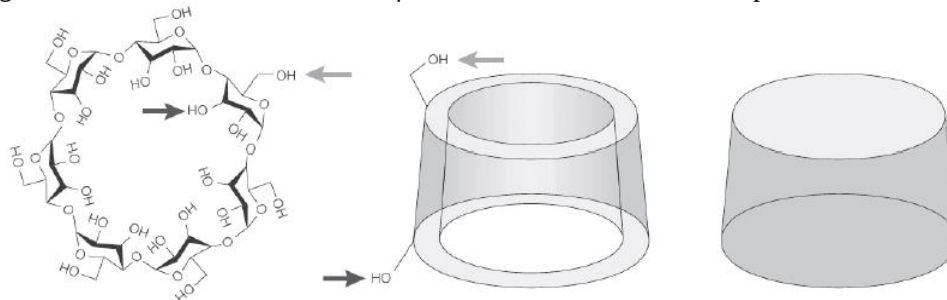
Atualmente, as CDs são amplamente usadas pela indústria farmacêutica, particularmente devido às suas propriedades complexantes que permitem: aumentar a solubilidade e dissolução dos fármacos pouco solúveis; aumentar sua biodisponibilidade e estabilidade; diminuir a irritação gástrica, dérmica ou ocular causada por determinados fármacos; diminuir ou eliminar odores e sabores desagradáveis; prevenir interações entre fármacos distintos ou entre o fármaco e excipientes (SZEJTLI, 1994).

2.3.1 Estrutura e síntese das ciclodextrinas

As CDs são compostas por unidades de D-glucopirranose unidas por ligações α -1,4. Em decorrência da conformação do carbono C₁ dos resíduos de D-glicopiranosil e da ausência de rotação livre em torno das ligações glicosídicas, as CDs não são moléculas perfeitamente cilíndricas, apresentando estrutura macroscópica tronco-cônica (Fig. 12) (AHSAN *et al.*, 2001; XIE *et al.*, 2014).

As hidroxilas primárias e secundárias das CDs estão direcionadas para o exterior da molécula, conservando um perfil hidrofílico em sua superfície externa. Já os pares de elétrons livres dos oxigênios envolvidos nas ligações glicosídicas estão direcionados para a porção interna da molécula, acarretando uma elevada densidade eletrônica e, conseqüentemente, o perfil hidrofóbico (Fig. 13) (LYRA *et al.*, 2010, RODRIGUES *et al.*, 2011). A forma cônica e a orientação dos grupos hidroxílicos para o exterior conferem a estes oligossacarídeos cíclicos propriedades físico-químicas singulares, dissolvendo-se em meio aquoso e, ainda, sendo capaz de encapsular em sua cavidade interna moléculas hidrofóbicas (CUNHA-FILHO *et al.*, 2007).

Figura 13 – Estrutura tronco-cônica da β -CD evidenciando as hidroxilas primárias e secundárias.



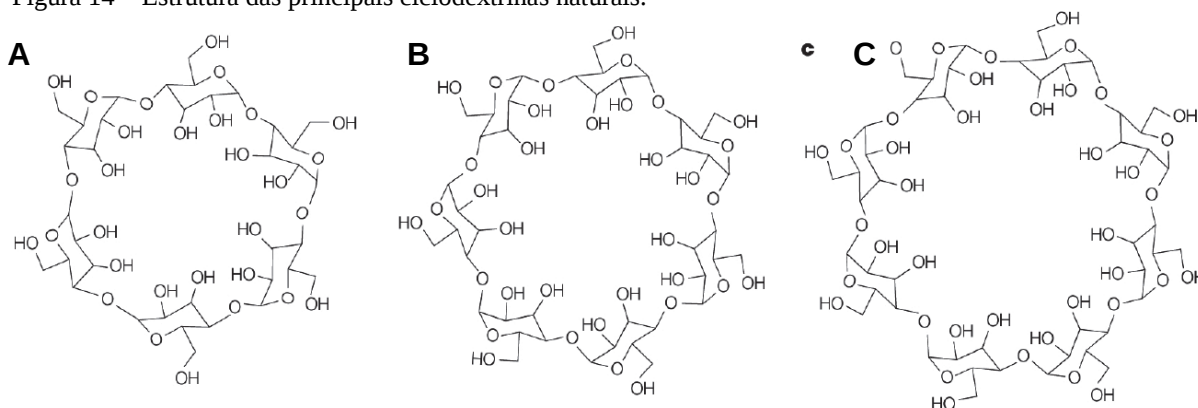
Fonte: Uekama *et al.* (1998).

As CDs são naturalmente sintetizadas a partir da degradação do amido pela ação das enzimas glicosiltransferases (CGTases). As CGTases são responsáveis pelo quebra das ligações glicosídicas do amido e são produzidas por alguns microrganismos como *Baccillus macerans*, *Baccillus alcalofilico*, *Baccillus circulans* e *Klebsiella pneumoniae* (SICARD, SAINÉZ, 1987; JUN *et al.*, 2007; DEORSOLA *et al.*, 2014). Dependendo do tipo de microrganismo envolvido no processo e das condições de reação, são sintetizados diferentes tipos de CDs (VEIGA, PERCORELLI *et al.*, 2006). Os avanços biotecnológicos na descoberta da sequência e clonagem da maioria dos genes das CGTase fez com que essas enzimas passassem a ser disponibilizadas a reduzido custo, promovendo um aumento na produção das CDs naturais e contribuindo decididamente para a produção em larga escala (GUEDES *et al.*, 2008).

2.3.2 Ciclodextrinas naturais e sintéticas.

As CDs naturais obtidas com maior rendimento são α -CD, β -CD e γ -CD (Fig.14), constituídas por seis, sete e oito unidades de D-glicopiranosose, respectivamente, apresentando diâmetro e peso molecular crescentes (CANNAVÀ *et al.*, 2008; LYRA, 2010; YANG *et al.*, 2012). No que diz respeito à solubilidade β -CD, é menos solúvel que as demais devido à ocorrência de ligações intramoleculares fortes que tornam a estrutura mais rígida. O número ímpar de unidades de glicopiranosose leva à formação de ligações hidrogênio intramoleculares entre os grupos hidroxila, tornando-os indisponíveis para interagir com as moléculas de água circundantes (LOFTSSON, BREWSTER, 2010).

Figura 14 – Estrutura das principais ciclodextrinas naturais.



Fonte: Davis, Brewster (2004). A) α -ciclodextrina; B) β -ciclodextrina; C) γ -ciclodextrina.

Devido às alterações das propriedades físico-químicas originais, os derivados sintéticos das CDs oferecem maior capacidade de inclusão, solubilidade aquosa, estabilidade e menor toxicidade. Assim, as CDs naturais vêm sendo gradativamente substituídas ao longo dos anos, principalmente, nas formulações farmacêuticas (DE LIMA GUEDES *et al.*, 2008; DOS SANTOS, BUERA, MAZZOBRE, 2012)

As modificações estruturais das CDs geralmente são feitas por reações de substituição nos grupos hidroxílicos primários e secundários por diversos grupos funcionais, como grupos metil, hidroxipropil, acetil, etil e derivados iônicos (VEIGA *et al.*, 2006). Desse modo, surgiram promissores derivados semi-sintéticos com elevada capacidade de reconhecimento molecular e solubilidade aquosa, como a hidroxipropil- β -CD (HP β CD), a hidroxipropil- γ -CD (HP γ CD), a sulfo-butil-éter- β -CD (SB β CD) e a metil- β -CD randomizada (RM β CD), ampliando suas possibilidades de utilização (MOSHER, THOMPSON, 2002; de LIMA GUEDES *et al.*, 2008).

As propriedades físico-químicas das β -CD metiladas são significativamente alteradas quando comparadas com o precursor natural (SZEJTLI, 1991). Esses derivados são obtidos por metilação seletiva como o caso da 2-O-metil- β -ciclodextrina (M β CD). A metilação em C2 e C6 favorecem a cavidade hidrofóbica e a maior solubilidade em água da M β CD (VEIGA *et al.*, 2006). CDs metiladas são capazes de incrementar a solubilidade das drogas incluídas, fornecer proteção à hidrólise e à luz, além de promover aumento da biodisponibilidade (LOFTSSON, BREWSTER, 1996; KAUKONEN, KILPELAINEN, MANNERMAA, 1997; MANNILA *et al.*, 2005; CUNHA-FILHO, MARTÍNEZ-PACHECO, LANDIN, 2013; MATHIRON *et al.*, 2013)

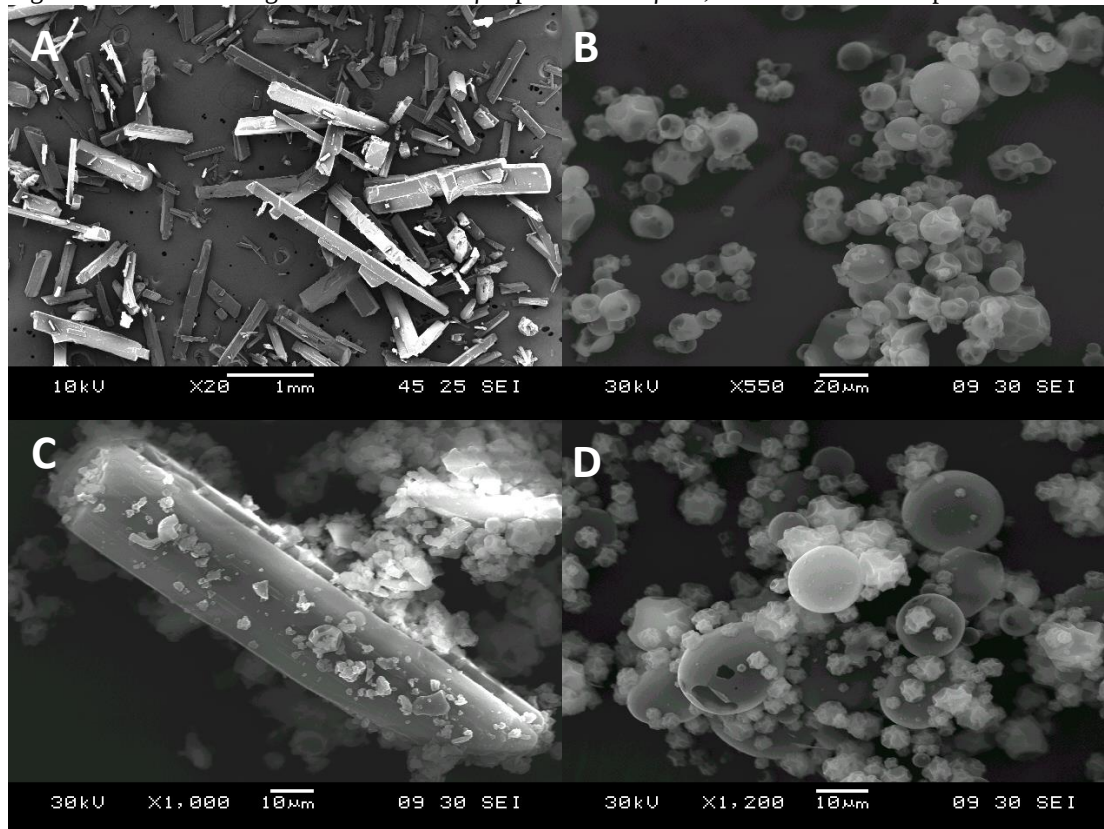
2.3.3 Complexo de inclusão β -lapachona em 2-O-metil- β -ciclodextrina

Como exposto anteriormente, as CDs podem formar complexos não específicos com uma grande variedade de substratos. A principal condição para que haja a complexação de modo eficiente é a capacidade do substrato em adaptar-se à cavidade das CDs (LIPKOWITZ, 1998; VALENTE, SÖDERMAN, 2013). Dessa forma, moléculas pequenas são capazes de formar complexos com α - e β -CD mais facilmente do que com γ -CD devido à compatibilidade entre o volume do substrato e da cavidade da CD. Também é sabido que o fenômeno de reconhecimento molecular entre o substrato e a CDs envolve interações não covalentes, sendo mediadas ligações de hidrogênio, interações eletrostáticas, forças de van der Waals, efeito hidrofóbico, interações dipolo-dipolo, transferências de cargas e efeitos estéreos. Em suma, nenhuma interação fraca sozinha é capaz de levar à interação específica de duas moléculas. Tal fato só ocorrerá através da cooperação de diversas interações fracas simultâneas (VENTURINI, 2008; TIWARI, TIWARI, RAI, 2010).

De modo sintético, o mecanismo de complexação pode ser organizado sequencialmente da seguinte forma: saída das moléculas de água que solvatam a cavidade interna das CDs e a porção apolar do substrato, as quais formam interações energeticamente desfavoráveis; mudanças conformacionais do receptor e do substrato; interação receptor/substrato; reorganização do solvente em torno e no interior da cavidade; e relaxamento estrutural do complexo (CRAMER, SAENGER, SPATZ, 1967; VENTURINI, 2008; TIWARI, TIWARI, RAI, 2010).

β -lap é uma molécula apolar, pouco solúvel e relativamente pequena, visível macroscopicamente, com cristais aciculares bem definidos de tamanho regular (Fig.15A) (HOOKER 1936; SUN, GEISER, FRYDMAN, 1998; KIM *et al.*, 2015). As partículas de M β CD apresentam-se como partículas esféricas, com superfícies lisas, relativamente ocas de caráter não cristalino (Fig.14B). Quando analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), observa-se que a mistura meramente física mantém as propriedades físicas de ambas, não havendo interação entre a β -lap e a ciclodextrina no estado sólido (Fig.15C). Porém, quando submetidas à atomização, originam um produto heterogêneo de aparência não cristalina com a presença de partículas na forma tipicamente esférica, completamente distinta das partículas isoladas dos compostos iniciais (Fig.15D). Assim, pode-se inferir que a perda da estrutura cristalina leva ao aumento da solubilidade da β -lap (FREITAS NETO, 2012).

Figura 15 – Eletromicrografias de MEV da β -lapachona e M β CD, mistura física e complexo formado.



Fonte: Adaptado de Freitas Neto (2012). (A) β -lapachona (B) 2-*O*-metil- β -Ciclodextrina, (C) Mistura física, (D) Complexo (Spray-drying).

Em seu estudo sobre as propriedades físico-químicas da β -lap complexada em CDs, Freitas Neto (2012) também mostrou que a solubilidade da β -lap aumenta linearmente em função da concentração de M β CD, admitindo uma estequiometria de 1:1 (mol:mol), β -lap:MC β D para a obtenção dos complexos de inclusão (HIGUCHI *et al.*, 1965). Outros estudos também apontam o incremento da solubilidade de β -lap quando complexada em CDs (NASONGKLA, 2003; WANG, 2006; CAVALCANTI, 2011; TEIXEIRA, 2013).

Sabendo que a complexação leva ao aumento da solubilidade de drogas lipofílicas, amplificando a biodisponibilidade e, conseqüentemente, a eficácia terapêutica (BEIG, AGBARIA, DAHAN, 2013), nos propusemos a testar (*in vivo*) o potencial esquistossomicida da β -lap quando complexada por atomização a 2-*O*-metil- β -ciclodextrina (M β CD).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade esquistossomicida *in vivo* (modelo murino) da β -lapachona complexada em 2-O-metil- β -ciclodextrina (β -lap:M β CD) sobre *Schistosoma mansoni*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade esquistossomicida da β -lap:M β CD, *in vivo*, em diferentes estágios evolutivos do *Schistosoma mansoni* (esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens e vermes adultos).
- Quantificar vermes recuperados após perfusão em todos os camundongos.
- Analisar o padrão de ovoposição de todos os camundongos – oograma.
- Quantificar ovos em tecido hepático de todos os camundongos.
- Análise patologia: analisar o perfil patológico do tecido hepático de camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*, tratados e não tratados.
- Análise histomorfométrica: mensurar o número e o volume médio de granulomas hepáticos em camundongos infectados pelo *Schistosoma mansoni*, tratados e não tratados.
- Fazer a análise estatística dos dados coletados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS

Os experimentos foram iniciados após aprovação do processo nº23076.041381/2014-11 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE. Foram utilizados 140 camundongos Swiss webster (*Mus musculus*) (BRENER, 1959) fornecidos e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). Os animais foram alojados em gaiolas, em grupos de 10 animais, sobre cama de maravalha previamente autoclavada, mantidos à temperatura ambiente de 25°C e fotoperíodos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro com livre acesso à ração (Labina®/Purina, São Paulo-SP) e água estéril *ad libitum*.

Utilizou-se a cepa de *S. mansoni*, Belo Horizonte – Minas Gerais (BH), sensível ao PZQ, mantida através de sucessivas passagens entre caramujos - da espécie *Biomphalaria glabrata*, abrigados no Departamento de Medicina Tropical da UFPE - e camundongos Swiss webster, abrigados no Laboratório de Esquistossomose Experimental do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA.

4.2 MANUTENÇÃO DA CEPA DE *Schistosoma mansoni*: INFECÇÃO DE CARAMUJOS, OBTENÇÃO DAS CERCÁRIAS E INFECÇÃO DOS CAMUNDONGOS.

Os caramujos foram infectados com miracídios obtidos a partir das fezes de camundongos (camundongos de manutenção) parasitados pelo *S. mansoni*. As fezes foram coletadas e tratadas de acordo com a técnica de sedimentação espontânea (HOFFMAN, 1934). O material fecal foi submetido a sucessivas lavagens em água destilada, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento distribuído em placas de Petri. As placas foram expostas à iluminação artificial (lâmpadas elétricas), à temperatura de 28°C por, aproximadamente, 50 minutos, tempo necessário para liberação dos miracídios. Com auxílio de uma lupa, os miracídios foram visualizados. A suspensão contendo os miracídios (n=8) foi colocada nos poços da placa com 16 poços. Posteriormente, os caramujos foram postos, individualmente, em contato com os miracídios, permanecendo expostos à luz artificial e à temperatura de 28°C por,

aproximadamente, duas horas. Em seguida, os moluscos foram transferidos para aquários contendo água mineral e ao abrigo da luz (STANDEN, 1952).

A cada ciclo infeccioso 80 moluscos foram infectados, a fim de obter homogeneidade entre os sexos do parasito (PELLEGRINO, KATZ, 1968).

Decorridos 30 dias após infecção, visando à obtenção de cercárias, os moluscos foram expostos à luz e à temperatura de 28°C por, aproximadamente, 50 minutos, em recipientes de vidro contendo água destilada (STIREWALT, 1954). Alíquotas da suspensão cercariana contendo 50 cercárias foram usadas para infectar por via percutânea os camundongos (OLIVIER, STIREWALT, 1952), os quais haviam sido previamente anestesiados por via intramuscular, com Dopalen® (Ketamina) e Anasedan® (Xilazina) na proporção de 1:2. Em seguida, sedados e com os olhos vendados foram expostos à luz por 60 minutos, depois foram devolvidos as suas gaiolas e acomodados em ambiente adequado.

4.3 COMPOSTOS

β -lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona) (MM = 242,3g/mol) complexada em ciclodextrina 2-O-Metil- β -ciclodextrina (M β CD; CRYSMEB®, MM = 1190g/mol e DS = 0,5) foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco- UFPE. Praziquantel foi adquirido da Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

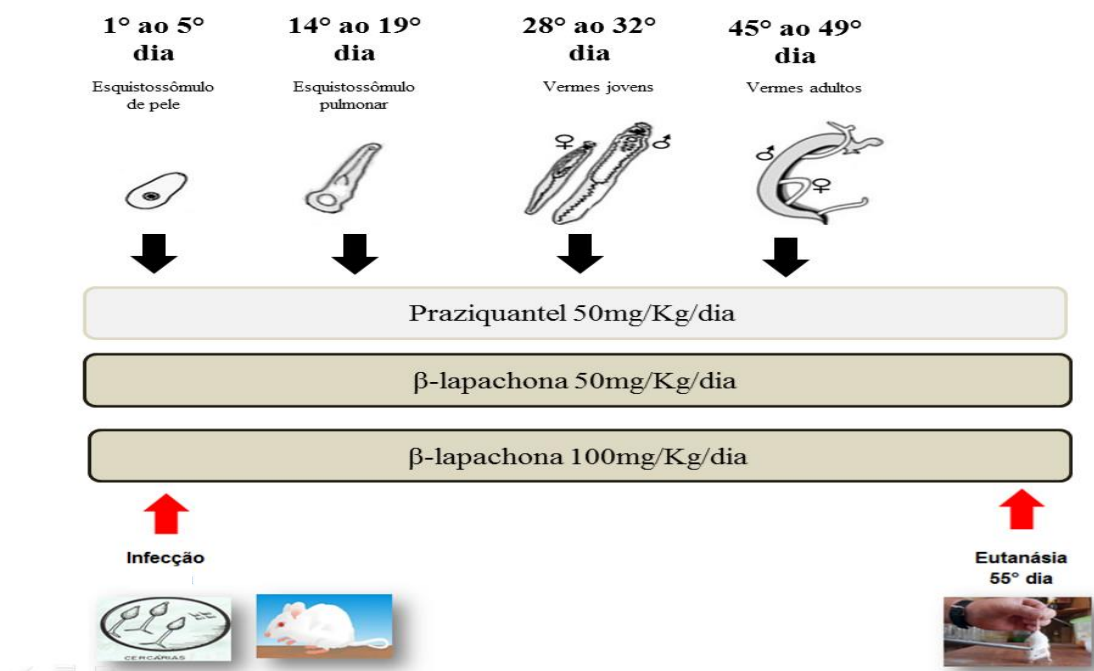
4.4 FORMAÇÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS E TRATAMENTO

Camundongos fêmeas Swiss com 30 dias de idade (~30g) foram infectados e distribuídos aleatoriamente em subgrupos com 10 animais. Cada subgrupo teve sua terapia iniciada no 1°, 14°, 28° e 45° dias após infecção. As administrações foram feitas durante 5 dias consecutivos, via oral, por gavagem. Doses de 50mg/kg/dia ou 100mg/kg/dia de β -lap complexada em M β CD foram administradas. O complexo foi solubilizado em solução salina a cada administração. Esse esquema possibilitou avaliar a eficácia do complexo β -lap/ M β CD contra diferentes estágios de desenvolvimento de *S. mansoni*: esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens (antes de oviposição) e vermes adultos (após a oviposição). Também foi formado um grupo

Controle livre de tratamento, um grupo que recebeu M β CD (Gupro M β CD) e um grupo controle que recebeu Praziquantel (PZQ) 50mg/Kg/dia.

Todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical 55 dias após a infecção.

Figura 16. Esquema de formação dos grupos experimentais.



Fonte: Do autor (2016). A figura apresenta o esquema simplificado dos protocolos terapêuticos seguidos neste experimento. Mostra desde a infecção dos camundongos até a eutanásia no 55° dia pós-infecção. Cada seta em preto aponta na direção dos três subgrupos que receberam PZQ, β -lap:M β CD 50mg/Kg/dia ou β -lap:M β CD 100mg/Kg/dia nos estados evolutivos a que fazem menção.

4.4.1 Parâmetros parasitológicos.

Recuperação dos vermes

Após eutanásia dos camundongos foi feita uma incisão inicial na parte inferior do abdômen dos animais estendendo-se até a caixa torácica. Seguidamente, com auxílio de pinça e tesoura cirúrgicas foi feita a perfusão injetando-se solução salina (cloreto de sódio a 0,85% e citrato de sódio 1,5%) na veia cava inferior (PELLEGRINO; SIQUEIRA, 1956). Solução salina também foi injetada na aorta descendente, procedendo-se à perfusão das veias mesentéricas (DUVALL; DE WITT, 1967). Ao final, foi feita a contagem dos vermes recuperados em cada camundongo.

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 vermes obtidos a partir de animais infectados não tratados.

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

Oograma

Foram removidos três fragmentos (1cm cada) da porção média do intestino delgado e lavados com solução salina para remoção das fezes remanescentes, em seguida, os tecidos foram postos em lâmina para microscopia e recobertos por lamínula. Com auxílio do microscópio óptico, observou-se 10 campos por lâmina (objetiva 10X). Os ovos encontrados foram contados e classificados em maduros, imaturos ou mortos (PELLEGRINO *et al.*, 1962).

Quantificação de ovos em tecido hepático

Um fragmento (0,3 gramas) da parte central do lóbulo direito de cada fígado foi removido e processado individualmente, segundo técnica de digestão hepática em hidróxido de potássio 4% (KOH) descrita por Cheever (1968). A estimativa do número de ovos por grama de tecido hepático foi feita após contagem dos ovos, com auxílio de microscópio ótico (objetiva 4X).

4.4.2 Estudo histopatológico e histomorfometria do tecido hepático – Técnica de Cheever

Amostras de tecido hepático da parte central do lobo lateral esquerdo foram coletadas de todos os camundongos e, posteriormente, fixadas em solução de formalina 10% tamponada com PBS. Após fixação, os tecidos foram desidratados, diafanizados e incluídos em parafina. Os cortes foram feitos à espessura de 5µm, corados com Hematoxilina/Eosina (HE) e observados ao microscópio ótico. Dez campos aleatórios por amostra histológica foram empregados para a contagem do número médio de

granulomas e avaliação histopatológica. Vinte granulomas (contendo um único ovo central) por lâmina foram selecionados aleatoriamente e empregados para determinar o diâmetro médio dos granulomas (PHILLIPS *et al.*, 1977). As imagens foram obtidas usando um microscópio ótico Eclipse E200 da Nikon® acoplado a uma câmera digital Moticam 2300 3.0 Mega pixels USB 2.0 e programa de computador Imagens Motic Plus 2.0 MLTM.

4.4.3 Critérios de interpretação dos resultados

Recuperação dos vermes

Todos os vermes (acasalados ou não) recuperados durante a perfusão dos vasos mesentéricos e hepáticos dos camundongos foram contabilizados.

Consideramos que, quanto menor o número de vermes recuperados em um subgrupo mais eficaz é o fármaco sobre a referida fase evolutiva do *S. mansoni*: tratados no 1º pós-infecção (esquistossômulo de pele); 14º pós-infecção (esquistossômulo pulmonar; 28º pós-infecção (verme jovem;) e 45º pós-infecção (verme adulto).

Oograma

Todos os ovos maduros, imaturos e mortos encontrados na investigação do tecido intestinal foram contabilizados.

Os ovos foram considerados maduros quando o embrião estava ocupando toda sua área interna; quando havia em seu interior um miracídio completamente formado; ausência de células mitóticas; com envelope de von Lichtenberg delgado (PELLEGRINO *et al.*, 1962; JURBERG *et al.*, 2009).

Foram considerados ovos imaturos, independentemente do estágio, aqueles que não continham embrião visível em seu interior ou o embrião não ocupava toda a área interna do ovo; embrião em formato discoide ou alongado; quando células vitelínicas eram visíveis, às vezes organizadas em núcleos nos polos embrionários; e o envelope de von Lichtenberg apresentando-se mais espesso. Em alguns casos, a parte mais central do ovo mostrava-se como uma massa clara desorganizada e as extremidades mais escuras (PELLEGRINO *et al.*, 1962; JURBERG *et al.*, 2009) .

Os ovos foram considerados mortos quando havia retração do embrião ou do miracídio. Podendo apresentar-se granular, parcialmente ou completamente enegrecido, com contornos irregulares e até mesmo calcificado (PELLEGRINO *et al.*, 1962; JURBERG *et al.*, 2009) .

Consideramos que, quanto maior a quantidade de ovos maduros e mortos encontrados em relação ao número de ovos imaturos, maior a interferência do fármaco sobre o padrão de oviposição.

Quantificação de ovos em tecido hepático

Após digestão do tecido hepático com KOH 4% todos os ovos encontrados na alíquota analisada foram contabilizados.

Consideramos que, quanto menor o número de ovos encontrados no fragmento analisado maior a interferência do fármaco sobre a oviposição.

Análise histopatológica e histomorfométrica do tecido hepático

Para análise do número de granulomas esquistossomóticos distribuídos ao longo do parênquima hepático foram contabilizadas todas as formações granulomatosas que continham ovo do *S. mansoni*. Formações granulomatosas sem vestígio de ovo do *S. mansoni* não foram incluídas na contagem.

Na estimativa do volume médio do granuloma esquistossomótico foram considerados passíveis de mensuração os granulomas que continham o ovo do *S. mansoni* centralizado, resultando numa formação granulomatosa esférica. O diâmetro médio desses granulomas foi obtido e o raio aplicado à fórmula do volume da esfera

$$v = \frac{3}{4}\pi r^3.$$

4.4.4 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do GraphPad Prism 6.0., utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA através da análise de variância (Tukey). Os dados foram expressos como a média $\pm$ DP. Em todos os casos, os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADO

5.1 EFEITO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO β -lap:M β CD EM DIFERENTES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DO *S. mansoni*

O Grupo M β CD apresentou número médio de vermes recuperados de $32,25 \pm 6,475$; valor estatisticamente semelhante ao grupo Controle livre de tratamento, qual seja, $32,15 \pm 2,853$ vermes. Assim sendo, observamos que *in vivo* M β CD mostra-se terapeuticamente inerte sobre os diferentes estágios evolutivos do *S. mansoni*.

A β -lap:M β CD reduz significativamente a carga total de vermes quando comparada ao Controle e Grupo M β CD, causando diminuição de 33,56%, 35,7%, 35,45% e 36,45%, quando a dose administrada foi 50mg/kg/dia, e 65,00%, 60,34%, 52,72% e 65,00%, quando a dose administrada foi 100mg/kg/dia, no 1° (esquistossômulo de pele), 14° (esquistossômulo pulmonar), 28° (verme jovem) e 45° (verme adulto) dias, respectivamente. Redução semelhante foi observada no número de vermes fêmeas recuperadas nos subgrupos tratados com β -lap:M β CD, como pode ser visto na tabela 1. A maioria dos vermes recuperados estavam acasalados e encontravam-se nos vasos mesentéricos.

Não houve variação percentual significativa quando a mesma dose foi administrada em estágios evolutivos distintos.

As comparações entre subgrupos tratados no mesmo estágio evolutivo submetidos a protocolos terapêuticos distintos mostraram que houve redução significativa na carga total de vermes e vermes fêmeas recuperados nos grupos que receberam 100mg/kg/dia nas fases de esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar e vermes adultos quando comparados aos subgrupos do mesmo estágio evolutivo que receberam 50mg/kg/dia. Os animais tratados na fase de verme jovem, aos quais foram administrados 100mg/kg/dia de β -lap, não apresentaram diferença estatisticamente significativa na carga parasitária, em comparação ao grupo que recebeu a metade da dose nesta mesma fase.

Não existiu diferença significativa entre a redução causada pelo PZQ e 100mg/kg/dia de β -lap:M β CD sobre a carga parasitária total dos subgrupos que receberam as administrações no 1° e 28° dias. Logo, houve redução da carga parasitária estatisticamente equivalente nestes dois estágios evolutivos. Os resultados ainda

mostraram que a dose de 50mg/kg/dia de PZQ reduziu em 100% o número de vermes recuperados no subgrupo tratado na fase de vermes adultos, como expresso na tabela 1.

Também foi possível notar que os animais tratados com β -lap:M β CD apresentaram número de ovos por grama de tecido hepático significativamente menor que os animais do grupo Controle e Grupo M β CD. O percentual de redução foi de 40,66%, 42,30%, 35% e 50,95% nos subgrupos tratados com 50mg/kg/dia, e 50,45%, 51,11%, 43,81% e 54,39% nos subgrupos tratados com 100mg/kg/dia, quando a dose foi administrada nos 1º, 14º, 28º e 45º dias pós-infecção, respectivamente (Tabela 1). Ainda dentro desta análise, observamos que não houve diferença estatisticamente significativa na redução de ovos por grama de tecido hepático, quando a dose de β -lap:M β CD foi duplicada de 50mg/Kg/dia para 100mg/kg/dia nos quatro estágios evolutivos (Tabela 1).

A análise do oograma mostrou modificações percentuais significativas ($p < 0,001$) no número de ovos imaturos, maduros e mortos, quando as doses de 50mg/kg/dia ou 100mg/kg/dia foram administradas na fase de vermes adultos. Todos os subgrupos deste experimento continham ovos de *S. mansoni*, porém, vale ressaltar, que no subgrupo tratado com PZQ, no 45º pós-infecção, não foram encontrados ovos imaturos.

O grupo M β CD apresentou número de ovos imaturos, maduros e mortos semelhantes ao grupo Controle, não havendo diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos.

O número de ovos imaturos, maduros e mortos dos subgrupos tratados com 50mg/kg/dia ou 100mg/kg/dia de β -lap:M β CD no 45º dia pós-infecção mostraram modificações percentuais estatisticamente significativas, quando comparados ao grupo Controle e Grupo M β CD, como pode ser visto na Figura 17. Nesta mesma fase, PZQ causou inversão do oograma. Nos subgrupos tratados na fase de vermes adultos com 50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia, a média de ovos mortos foi de $20,00 \pm 5,372$ e $24,43 \pm 3,50$, respectivamente; enquanto que no grupo Controle foi de apenas $6,41 \pm 1,46$ e no Grupo M β CD de $5,69 \pm 1,43$. Nos demais estágios evolutivos (1º, 14º e 28º dias pós-infecção) β -lap:M β CD e PZQ não foram capazes de modificar de modo expressivo os percentuais de ovos imaturos, maduros e mortos em ambas as dosagens testadas

Tabela 1. Efeitos da β -lapachona complexada em 2-O-metil- β -ciclodextrina sobre a carga de vermes, ovos no tecido hepático e número médio de granulomas em camundongos albergando diferentes estágios de desenvolvimento do *S. mansoni*, eutanaziados no 55º dia pós-infecção.

Administração: dias pós-infecção/ estágios de desenvolvimentos e grupos	Número médio de vermes				Número de ovos/g de tecido		Granuloma esquistossomótico hepático	
	Total	Redução (%)	Fêmeas	Redução (%)	Hepático $\times 10^3$	Redução (%)	Número médio	Redução (%)
Controle	32,15 $\pm$ 2,85		14,82 $\pm$ 1,62	-	6,09 $\pm$ 0,31	-	5,97 $\pm$ 0,56	-
M β CD	32,25 $\pm$ 6,47		15,63 $\pm$ 3,20	-	6,65 $\pm$ 1,00	-	5,20 $\pm$ 1,23	-
1º dia/ esquistossômulo de pele								
β -lapachona 50mg/kg/dia	21,36 $\pm$ 3,04 ^{*a}	33,56	10,36 $\pm$ 1,50 ^{*a}	30,09	3,61 $\pm$ 0,58 ^{*c}	40,66	3,92 $\pm$ 0,34 [*]	34,19
β -lapachona 100mg/kg/dia	11,25 $\pm$ 0,95 [*]	65,00	5,20 $\pm$ 0,44 [*]	64,91	3,02 $\pm$ 0,38 [*]	50,459	3,62 $\pm$ 0,34 [*]	39,29
PZQ 50mg/kg/dia	9,50 $\pm$ 5,09 [*]	70,45	5,00 $\pm$ 2,12 [*]	66,26	2,21 $\pm$ 0,29 [*]	63,63	3,85 $\pm$ 0,64 [*]	35,52
14º dia/ esquistossômulo pulmonar								
β -lapachona 50mg/kg/dia	20,67 $\pm$ 2,59 ^{*b}	35,70	9,55 $\pm$ 1,81 ^{*e}	35,51	3,51 $\pm$ 0,69 [*]	42,30	4,45 $\pm$ 1,20 ^{***}	25,47
β -lapachona 100mg/kg/dia	12,75 $\pm$ 1,89 ^{*c}	60,34	5,75 $\pm$ 0,95 [*]	61,53	2,98 $\pm$ 0,53 [*]	51,11	3,15 $\pm$ 0,19 [*]	48,08
PZQ 50mg/kg/dia	20,33 $\pm$ 2,94 [*]	36,76	7,83 $\pm$ 1,32 [*]	47,14	2,90 $\pm$ 0,33 [*]	52,42	4,00 $\pm$ 0,38 [*]	35,52
28º dia/verme jovem								
β -lapachona 50mg/kg/dia	20,75 $\pm$ 3,41 [*]	35,45	9,37 $\pm$ 1,92 [*]	36,74	3,96 $\pm$ 0,95 [*]	35,00	4,28 $\pm$ 1,30 ^{**b}	28,32
β -lapachona 100mg/kg/dia	15,20 $\pm$ 2,16 [*]	52,72	6,80 $\pm$ 1,30 [*]	54,11	3,42 $\pm$ 0,40 [*]	43,81	2,58 $\pm$ 0,34 ^{*c}	56,74
PZQ 50mg/kg/dia	21,25 $\pm$ 2,49 [*]	33,90	8,75 $\pm$ 1,16 [*]	40,95	3,59 $\pm$ 0,14 [*]	41,10	4,12 $\pm$ 0,62 ^{**}	30,91
45º dia/verme adulto								
β -lapachona 50mg/kg/dia	20,43 $\pm$ 3,26 ^{*b,d}	36,45	9,42 $\pm$ 1,81 ^{*b,d}	36,37	2,99 $\pm$ 0,39 [*]	50,95	4,43 $\pm$ 0,37 ^{**c,f}	25,82
β -lapachona 100mg/kg/dia	11,25 $\pm$ 1,89 ^{*d}	65,00	5,66 $\pm$ 1,21 ^{*d}	61,76	2,78 $\pm$ 0,14 [*]	54,39	2,44 $\pm$ 0,26 [*]	58,71
PZQ 50mg/kg/dia	0,0 $\pm$ 0,0 [*]	100	0,0 $\pm$ 0,0 [*]	100	1,99 $\pm$ 0,32 [*]	67,32	3,06 $\pm$ 0,53 [*]	48,75

*p<0,001 **p<0,01 ***p<0,05 diferença significativa em comparação ao grupo Controle.

^ap<0,001 diferença significativa entre subgrupos no mesmo estágio evolutivo, quando comparado a β -lap100mg/kg/dia e PZQ.

^bp<0,01 diferença significativa entre subgrupos no mesmo estágio evolutivo, quando comparado a β -lap 100mg/kg/dia.

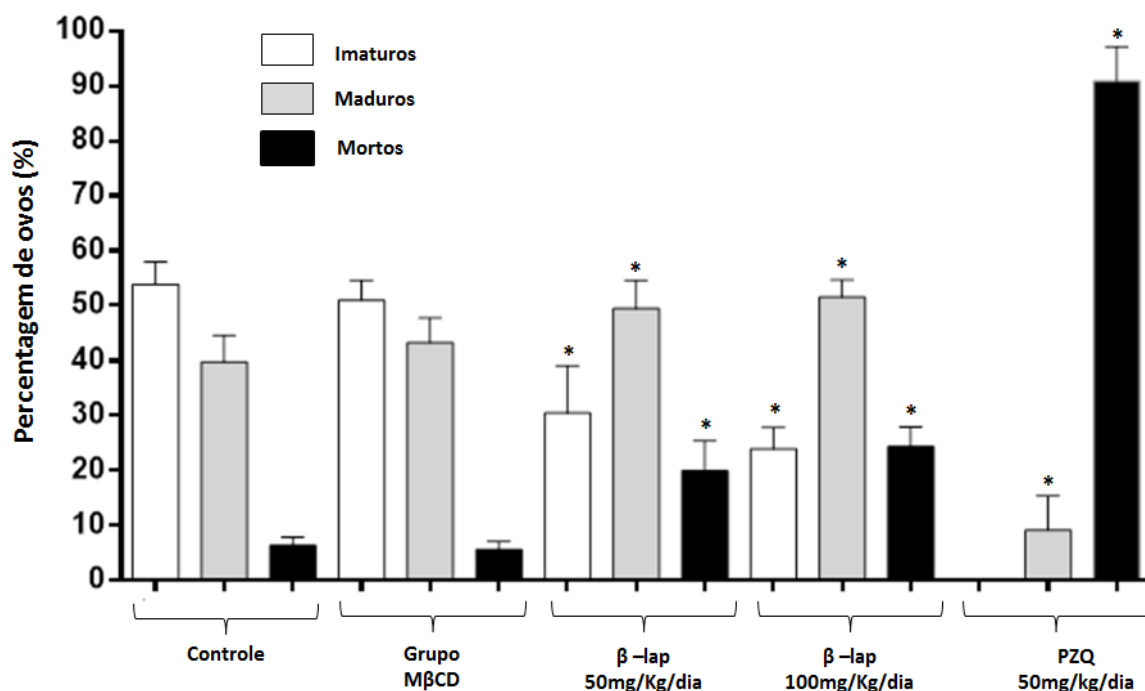
^cp<0,05 diferença significativa entre subgrupos no mesmo estágio evolutivo, quando comparado a PZQ 50mg/kg/dia.

^dp<0,001 diferença significativa entre subgrupos no mesmo estágio evolutivo, quando comparado a PZQ50mg/kg/dia.

^ep<0,05 diferença significativa entre subgrupos no mesmo estágio evolutivo, quando comparado a β -lap 100mg/kg/dia.

^fp<0,001 diferença significativa entre subgrupos no mesmo estágio evolutivo, quando comparado a β -lap 100mg/kg/dia.

Figura 17. Gráfico da percentagem de ovos imaturos, maduros e mortos do *S. mansoni* a partir da análise do oograma.



Fonte: Da autora (2016). A figura mostra o efeito da β -lap:M β CD e PZQ sobre o oograma de camundongos infectados pelo *S. mansoni*, quando administrados do 45º dia pós-infecção. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Controle.

5.2 EFEITO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO β -lap:M β CD SOBRE O GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTICO.

A β -lap:M β CD reduziu significativamente o número de granulomas distribuídos no parênquima hepático nos subgrupos tratados com ambas as doses testadas. Houve redução de 34,198%, 25,473%, 28,320% e 25,824% no número de granulomas hepáticos quando a dose administrada foi de 50mg/kg/dia, e 39,289 %, 48,082 %, 56,740 % e 58,712% quando a dose administrada foi de 100mg/kg/dia, na fase de esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, verme jovem e verme adulto, respectivamente. Esses resultados encontram-se organizados na Tabela 1.

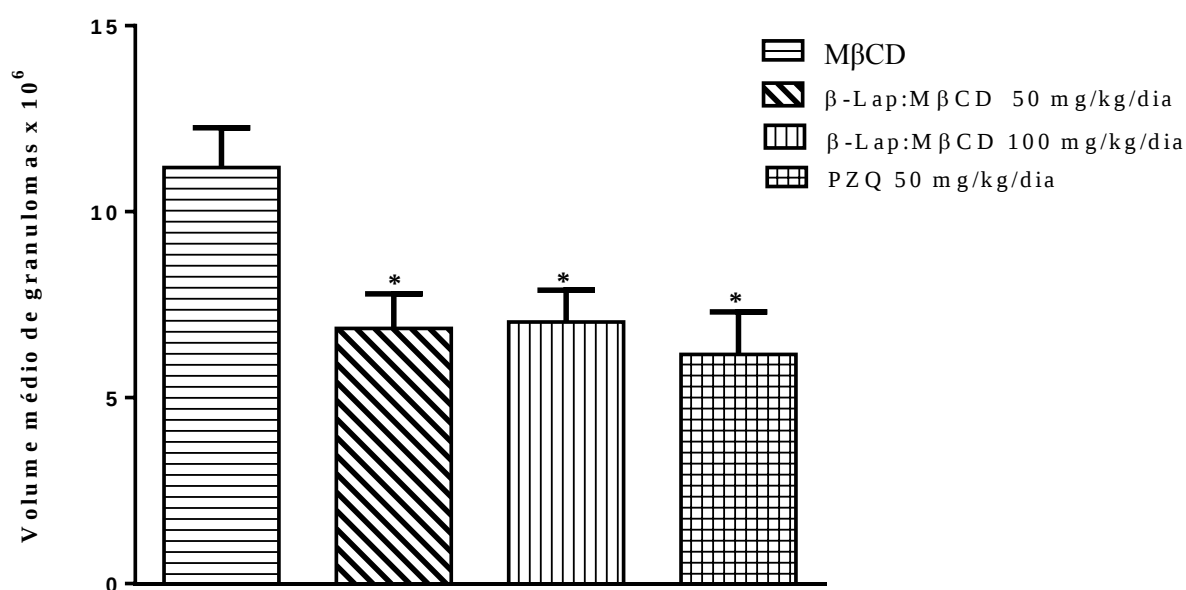
Não houve redução estatisticamente significativa no número de granulomas hepáticos quando a mesma dose foi administrada em estágios evolutivos distintos.

A duplicação da dose de β -lap:M β CD nas fases iniciais da infecção não causou redução estatisticamente significativa no número de granulomas presentes no parênquima hepático dos camundongos, quando comparados aos animais que receberam 50mg/kg/dia. Porém, β -lap:M β CD 100mg/Kg/dia administrada no 28º e 45º dias pós-infecção apresentou redução evidente e estatisticamente significativa, quando

comparada a redução causada pela dose de 50mg/Kg/dia administrada nesses dois estágios evolutivos.

PZQ 50mg/kg/dia foi capaz de reduzir significativamente o número de granulomas, quando administrado nos quatro estágios evolutivos, como pode ser visto na Tabela 1. Quando comparamos β -lap:M β CD com o PZQ, notamos que, após ambas as doses de β -lap:M β CD serem administradas no 1° e 14° dias pós-infecção, houve eficácia equivalente ao do PZQ. Logo, β -lap:M β CD (50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia) reduz o número de granulomas do tecido hepático de modo semelhante ao PZQ nesses dois estágios evolutivos. Vale ressaltar que β -lap:M β CD 100mg/Kg/dia foi significativamente mais eficaz que PZQ na redução do número de granulomas, quando administrada no 28° dia pós-infecção.

Figura 18. Gráfico do volume médio dos granulomas hepáticos encontrados nos sub-grupos tratados no 45° dia pós-infecção com M β CD, β -lap:M β CD (50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia) e PZQ.



Fonte: Do autora (2016). A figura mostra a redução no volume médio dos granulomas esquistosomóticos presentes no parênquima hepático de camundongos tratados com β -lap:M β CD ou PZQ no 45° dia pós-infecção. * $p < 0,0001$ quando comparado ao grupo β -lap:M β CD.

O Grupo M β CD apresentou número médio de granulomas estatisticamente semelhante ao grupo controle.

No que diz respeito às dimensões dos granulomas presentes no parênquima hepático dos camundongos tratados, pudemos observar que β -lap:M β CD 50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia, administrada na fase de vermes adultos, reduziu em 38,68% e 37,12% o volume médio dos granulomas quando comparados ao grupo M β CD, respectivamente. PZQ administrado no 45° dia pós-infecção causou 44,88% de redução no volume médio

dos granulomas quando comparado ao grupo M β CD. Esses dados podem ser visualizados na Figura 18. As reduções causadas pelas duas doses de β -lap:M β CD avaliadas nesse experimento foram estatisticamente equivalentes. Nos demais estágios evolutivos, a administração de β -lap:M β CD ou PZQ não causou diminuição significativa no volume médio dos granulomas.

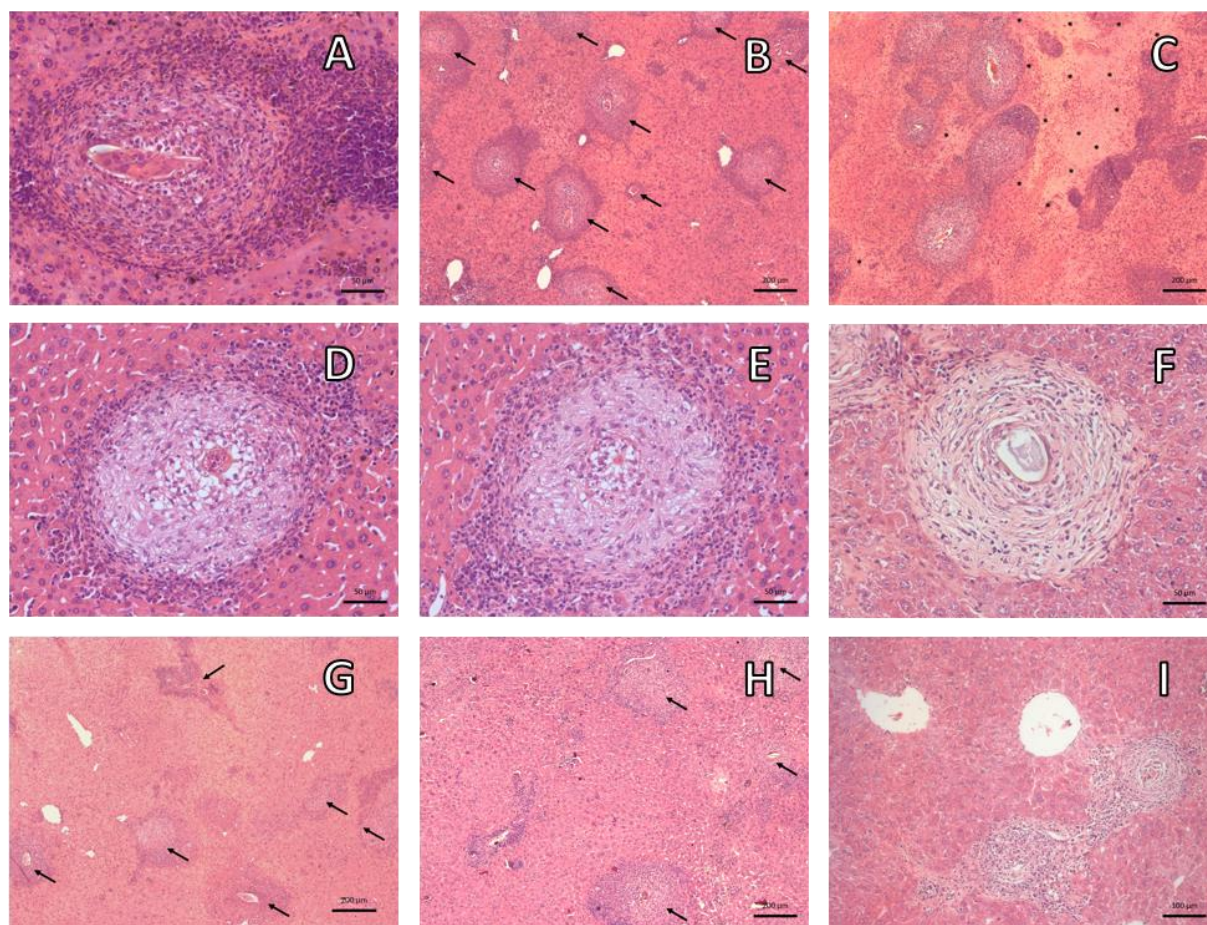
Não houve diferença estatisticamente significativa entre o volume médio dos granulomas hepáticos presentes no grupo Controle e o grupo M β CD.

A análise histopatológica do tecido hepático nos permitiu observar que em todos os grupos tratados e não tratados havia granulomas típicos, característicos da reação inflamatória granulomatosa exsudativa comum a esta parasitose, com ovo do *S. mansoni* comumente centralizado, em sua maioria degenerado e rodeados por múltiplas células do sistema imune (Fig. 19A). Ainda foi possível notar que a cápsula do fígado manteve-se preservada em todos os grupos.

Os grupos controle e M β CD apresentaram perfis semelhantes entre si, com presença de granulomas em padrões distintos distribuídos ao longo do parênquima hepático, isolados ou formando coalescências. Intensa resposta inflamatória granulomatosa com focos de necrose profunda e edema parenquimatoso hepático (Fig. 19B e C). Vestígios de pigmento esquistossomótico foram visualizados. Exsudação de eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares circundando o ovo, fibrócitos e fibras colágenas delicadas, além da intensa presença de linfócitos ativos, também visualizados nas imediações dos vasos hepáticos. Os subgrupos tratados com ambas as doses de β -lap:M β CD ou PZQ no 1° (esquistossômulo de pele), 14° (esquistossômulo pulmonar) e 28° (vermes jovens) dias pós-infecção apresentaram o mesmo perfil histopatológico do grupo controle, exceto pela não visualização de pigmento esquistossomótico.

Apesar de não ter havido redução no volume médio dos granulomas encontrados nos grupos tratados no 1°, 14° e 28° dias pós-infecção, pôde-se notar que os subgrupos tratados no 45° dia após infecção, com ambas as doses de β -lap:M β CD e PZQ, apresentaram perfil histopatológico distinto dos demais subgrupos tratados nos estágios evolutivos iniciais da infecção. Apresentando granulomas mais fibróticos, com aumento de fibroblastos e fibrócitos quando comparados aos demais grupos, bem como uma maior deposição de fibras colágenas mais densas do centro para a periferia do granuloma (Fig. 19D e F). Estes subgrupos também mostraram visível redução do infiltrado de linfócitos rodeando os vasos hepáticos e na periferia do granuloma esquistossomótico (Fig. 19G e H).

Figura 19. Fotomicrografias de secções do tecido hepático de camundongos infectados há 55 dias com *S. mansoni* e corados com hematoxilina-eosina (HE): não tratados (A-C); tratados com β -lap:M β CD 50mg/kg/dia (D e G) e 100mg/kg/dia (E e H); tratados com PZQ 50mg/kg/dia (F e I). Imagens capturadas com auxílio do Microscópio Image.M2m Axio.



Fonte: Da autora (2016). A – Controle - granuloma hepático contendo ovo centralizado de *S. mansoni*, com reação necrótica-exudativa periovular contendo múltiplas células do sistema imune, intenso infiltrado linfocitário e fibras colágenas delgadas (200X). B - Controle- numerosos granulomas distribuídos ao longo do parênquima hepático (setas) e vasos circundados por infiltrado de células do sistema imune (50X). C- Controle- extensa área de necrose no parênquima hepático (asteriscos) e intenso infiltrado linfocitário (pontas de setas), além de formações granulomatosas (50X). D- β -lap:M β CD 50mg/kg/dia- granuloma em fase produtiva com ovo centralizado, células do sistema imune distribuídas em sua extensão e fibras colágenas mais densas ocupando as áreas necróticas (200X). E- β -lap:M β CD 100mg/kg/dia- granuloma em fase produtiva com perfil semelhante ao da figura D (200X). F- PZQ 50mg/kg/dia- granuloma com limites bem definidos, ovo centralizado, pouco infiltrado linfocitário, extensa deposição de fibras colágenas concêntricas bem organizadas, densas e distribuídas na área de necrose (200X). G - β -lap:M β CD 50mg/kg/dia- imagem evidencia a redução no número de granulomas quando comparado ao grupo Controle e parênquima hepático mais preservado com redução do infiltrado linfocitário quando comparado às imagens B e C (50X). H- β -lap:M β CD 100mg/kg/dia- imagem evidencia redução no número de granulomas, parênquima hepático mais preservado e redução do infiltrado linfocitário quando comparado às imagens B, C e G (50X). I-PZQ 50mg/kg/dia- imagem mostra redução no número de granulomas, parênquima hepático mais preservado e redução do infiltrado linfocitário quando comparado às imagens B, C, G e H (100X) * $p < 0,0001$ diferença significativa entre subgrupos no mesmo estágio evolutivo quando comparado à β -lapachona 100mg/kg..

6 DISCUSSÃO

6.1 EFEITO DO COMPLEXO DE INCLUSÃO β -lap:M β CD EM DIFERENTES ESTÁGIOS EVOLUTIVOS DO *S. mansoni*.

O tratamento da esquistossomose está diretamente atrelado ao PZQ, atual fármaco de escolha no combate ao *S. mansoni* e demais espécies do gênero. O uso quase que exclusivo de uma única droga evidencia um grave problema, tendo em vista a disseminação da doença, os ineficazes programas de prevenção e a ameaça do surgimento de cepas resistentes e/ou sensíveis ao medicamento (ABDUL-GHANI *et al.*, 2009). O primeiro trabalho a mostrar o surgimento de cepas resistentes ao PZQ foi feito por Fallon e Doenhoff (1994), os quais relataram que doses subcurativas desse fármaco levam ao surgimento de cepas resistentes. Recentemente foram compilados em um único trabalho estudos que mostram o aparecimento de resistência ao PZQ em campo e em laboratório (WANG, WANG, LIANG, 2012). Esses achados e a eminente ameaça que PZQ torne-se ineficaz contra o *Schistosoma* fizeram com que a WHO incentivasse a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes esquistossomicidas (BERTÃO *et al.*, 2012). Além disso, PZQ não mostra eficácia plena quando administrado nas fases iniciais da infecção (GRYSSELS *et al.*, 2001; PICA-MATTOCIA, CIOLI, 2004), Portanto, nota-se que o surgimento de novos fármacos destinados ao combate da esquistossomose são de grande urgência no presente contexto. Ainda nessa conjuntura, Drescher *et al.* (1993) mostram que PZQ é bastante eficaz quando administrado na fase evolutiva de vermes adultos, este corrobora com nossos resultados visto que não foram encontrados vermes no subgrupo que recebeu PZQ no 45º pós-infecção.

Trabalhos preexistentes que tratam das novas terapias contra a esquistossomose e estudos que exploram o potencial esquistossomicida das naftoquinonas foram usados na fundamentação teórica desse trabalho, entre eles: o estudo de Magalhães *et al.* (2014), que analisou a atuação das naftoquinonas sobre os vermes adultos do *S. mansoni* (*in vitro*) e pôde perceber que 52,6% dos compostos testados - dentre eles extratos e moléculas isolados - levaram à morte de 100 % dos vermes quando incubados por 24h; Aires *et al.* (2013;2014), que mostraram a ação *in vitro* e *in vivo* da β -lap sobre os vermes do *S. mansoni*; o estudo de Edingl, Tersan e Waite, em 1947, demonstrou a inibição da glicólise anaeróbica em vermes adultos quando expostos a compostos naftoquinônicos; bem como a demonstração que β -lap e seus derivados são capazes de

bloquear a penetração das cercárias na pele de camundongos, feita por Pinto *et al.*, em 1997; entre outros trabalhos que seguiram esta linha de pesquisa.

Os grupos experimentais formados nesse trabalho foram elaborados com base em trabalhos científicos que analisaram a atividade de fármacos com potencial esquistossomicida em diferentes fases do desenvolvimento do *S. mansoni*. (EL-RIDI *et al.*, 1997; BARBOSA *et al.*, 1978; BOTROS *et al.*, 2003; MARTINEZ *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2011; VIMIEIRO *et al.*, 2013).

Notamos que β -lap:M β CD interfere diretamente no ciclo de vida do *S. mansoni*, atuando sobre os quatro estágios evolutivos: esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, vermes jovens e vermes adultos. Além de reduzir a carga total de vermes, ela também foi capaz de reduzir o número de vermes fêmeas em proporções semelhantes. É de suma importância que novas moléculas esquistossomicidas sejam capazes de atuar em diversos estágios da infecção. β -lap:M β CD (50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia) mostrou-se mais eficaz nos subgrupos tratados no 45º dia pós-infecção, porém, nas fases iniciais, também demonstrou significativa redução da carga parasitária. É interessante que, além de causar a morte de vermes adultos - o que caracteriza um perfil curativo -, a droga também seja profilática (matando os esquistossômulos) e supressiva, inibindo a oviposição (MORAES *et al.*, 2011).

A atividade esquistossomicida da β -lap não complexada foi anteriormente testada *in vitro* (AIRES *et al.*, 2014), porém, testes *in vivo* permitem que a atividade da molécula seja avaliada perante a complexidade do metabolismo de um organismo vivo, diferentemente do que ocorre em testes *in vitro*, onde as condições ambientais podem ser moldadas e, por isso, muitas vezes servem como modelo de triagem na seleção de moléculas que podem vir a ser fármacos em potencial (RAMIREZ *et al.*, 2007). Além do mais, quando se trata de um possível fármaco esquistossomicida, testando-se a ação de um protótipo em uma cobaia parasitada, é possível avaliar sua ação sobre as diferentes formas evolutivas, redução do número de ovos e inibição do processo inflamatório granulomatoso.

A grande maioria dos vermes recuperados estavam acasalados e encontravam-se nos vasos mesentéricos, podendo-se inferir que β -lap não interfere no processo de acasalamento desse parasito. Ao completar a maturação sexual, os vermes do *S. mansoni* migram acasalados para os vasos mesentéricos, sendo comum que 60 a 70% dos helmintos recuperados na perfusão sejam encontrados nos vasos entéricos. Quando desacasalados, mudanças bioquímicas e fisiológicas acontecem, principalmente, na

fêmea, havendo regressão do ovário, da glândula vitelínica e diminuição do seu tamanho corpóreo. (PELLEGRINO, KATZ, 1968). Desacasalar os casais de vermes seria um interessante mecanismo de ação para um fármaco esquistossomicida, por interferir no ciclo reprodutivo do verme.

Além da quantificação de vermes recuperados nos grupos tratados, nossa análise levou em consideração alguns critérios sugeridos por Pellegrino e Katz (1968), como o número de ovos por grama de tecido hepático, número de ovos retidos no tecido intestinal (oograma), presença de granulomas no fígado e o volume médio desses. Tais critérios são fundamentais para avaliação da atividade esquistossomicida de um novo fármaco, segundo estes autores. Com base nesses requisitos, observamos que β -lap:M β CD causa diminuição no número de ovos por grama de tecido hepático, alteração do padrão de oviposição e redução do número de granulomas presentes no tecido hepático, como exposto na tabela 1 e figura 17.

A β -lap:M β CD foi capaz de alterar o padrão de oviposição, quando administrada no 45º dia pós-infecção. A partir da análise microscópica de fragmentos do intestino delgado, foram observados os estágios de desenvolvimento e maturação dos ovos de *S. mansoni* (PELLEGRINO *et al.* 1962). Essa modificação no oograma relaciona-se à interferência da β -lap: M β CD sobre os vermes fêmeas, quando administrada no 45º dia pós-infecção, impedindo que novos ovos sejam postos e causando o aumento no percentual de ovos maduros oriundos de posturas anteriores ao tratamento, estando de acordo com o trabalho de Mantawy *et al.* (2011). Também houve redução no número de ovos por grama de tecido hepático, sendo este um provável reflexo da interferência dessa molécula sobre a postura dos ovos. Resultado relevante quando partimos do pressuposto de que os ovos encalhados no fígado desencadeiam as complicações patológicas mais graves da esquistossomose.

Imediatamente após a postura, os ovos mantêm-se imaturos por aproximadamente 6 dias (1º a 4º estádios). A partir daí atingem a maturidade e são eliminados juntamente com as fezes ou morrem (tornam-se inviáveis) em aproximadamente 12 dias (SAVEL *et al.*, 2006). A postura mais acentuada acontece do 45º ao 72º dia pós-infecção (Martinez *et al.*, 2003). O oograma consiste em um dos parâmetros mais relevantes para demonstrar a eficácia de uma droga esquistossomicida, ainda que a mudança hepática não seja óbvia (Pellegrino *et al.*, 1977).

A diminuição da oviposição mostra-se como importante parâmetro para o surgimento de um novo fármaco esquistossomicida, já que o ovo é responsável por

disseminar o parasito e manter seu ciclo de vida. Além disso, as principais lesões causadas pelo *S. mansoni* ao organismo parasitado são decorrentes da presença dos ovos anuídos nos tecidos do hospedeiro, desencadeando reações inflamatórias e a formação dos granulomas (GRYSEELS *et al.*, 2006; KLAVER *et al.*, 2015).

Não podemos afirmar precisamente qual a molécula alvo presente no *S. mansoni* que interage primária ou secundariamente com β -lap, tendo em vista que seu mecanismo de ação ainda não foi devidamente explanado. Porém, é possível fazer inferências baseadas na literatura existente. Estudos sugerem que β -lap é responsável pela produção de espécies reativas de oxigênio. Os EROS e intermediários bioalquilantes provenientes do ciclo redox das quinonas podem causar estresse oxidativo celular, peroxidação lipídica, danos às proteínas e fragmentação do DNA (PINTO, CASTRO, 2009; FERREIRA, 2010). A redução na carga de vermes encontradas nos grupos tratados em nosso estudo pode está ligada à atuação da β -lap sobre o ciclo redox das numerosas mitocôndrias presentes no tegumento dos vermes do *S. mansoni*, causando lesões profundas e consequente morte do verme. Estudo recente indica que o plumbagina, outra naftoquinona, elimina vermes adultos do *S. mansoni* agindo sobre seu tegumento, mais precisamente sobre suas mitocôndrias (LORSUWANNARAT *et al.* 2013).

O tegumento é a interface entre o meio e o parasito, desempenha funções vitais para o verme, como a absorção de nutrientes, excreção, proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro. Ainda, apresenta proteínas reparadoras de danos, além de ser seletivo para absorção de fármacos e lipídeos. Dessa maneira, tal estrutura é considerada importante alvo farmacológico para novas drogas esquistossomicidas (LIMA *et al.*, 2011; BERTÃO *et al.*, 2012)

Outra possibilidade é a interação da β -lap com os canais de Ca^{2+} voltagem-dependente presentes na musculatura do helminto. Cavalcante *et al.* (2008) observaram que a musculatura lisa do intestino de cobaias é relaxada quando interage com β -lap. Esses pesquisadores chegaram a essa conclusão após notarem que esta molécula inibe a contração da musculatura causada pelo carbacol e pela histamina. Essa interação acarretaria a inibição da contractilidade e o consequente relaxamento da musculatura lisa do verme, levando à paralisia flácida e posterior morte. Dessa forma, β -lap seria um possível antagonista ao PZQ, já que esse fármaco atua na subunidade β dos canais de Ca^{2+} voltagem-dependente, aumentando o influxo de Ca^{2+} na musculatura lisa do

helmintho, ocasionando uma contração permanente que leva à paralisia espasmódica e subsequente morte do verme (DOENHOFF, CIOLI, UTZINGER, 2008).

β -lap apresenta baixa capacidade de dissolução em meio aquoso, fato atribuído por Brandão *et al.* (2008) a sua disposição estrutural em forma de retículo cristalino, dificultando, assim, a interação de suas moléculas com a água. Sua limitada solubilidade implica uma baixa dissolução perante os fluidos gastrointestinais e elevada capacidade em permear membranas (CUNHA FILHO, 2007). Recentemente, Kim mostrou que β -lap apresenta biodisponibilidade oral de 15,5%. O mesmo apontou que essa baixa biodisponibilidade é decorrente da sua precária solubilidade e ampla metabolização hepática e intestinal sofrida pela molécula (KIM, 2015).

Em nosso experimento, β -lap foi complexada em M β CD, o que, segundo Freitas Neto (2012), resulta no incremento da solubilidade, possibilitando uma maior absorção, distribuição e consequente melhora da biodisponibilidade, viabilizando sua atuação sobre os vermes do *S. mansoni*. Neste mesmo trabalho foi mostrado que, na forma cristalina, β -lap dissolveu-se, em média, 7,60%, enquanto a forma complexada por atomização em M β CD apresenta dissolução média de 98,87%. Esse dado no leva a concluir que β -lap complexada em M β CD pôde ser melhor absorvida e atingiu uma biodisponibilidade oral maior que o valor mostrado no trabalho de Kim (2015).

Em 2013, Aires *et al.* administraram 50mg/kg/dia de β -lap (não complexada) em camundongos, por via intraperitoneal, seguindo o mesmo protocolo terapêutico usado no presente trabalho para analisar o potencial esquistossomicida dessa molécula sobre diferentes estágios evolutivos do *S. mansoni*. Eles obtiveram uma redução na carga parasitária de 29,78%, 37,2%, 24,2% e 40,22%, quando o tratamento foi feito no 1°, 14°, 28° e 45° dias pós-infecção, respectivamente. Tendo em vista que a administração por via parenteral não precisa ser absorvida no trato gastrointestinal, como na acontece por via oral, e não sofre interferência direta do metabolismo de primeira passagem, devemos ressaltar que a complexação com M β CD incrementou a solubilidade de β -lap, surtindo efeitos satisfatórios sobre o seu potencial esquistossomicida. Por sua vez, nossos percentuais de redução, quando a mesma dose foi administrada oralmente, foram de 33,56%, 35,7%, 35,45% e 36,45% nos respectivos dias pós-infecção citados acima; porém, por uma via de administração que oferece mais infortúnios, como a extensa metabolização hepática. Além do mais, segundo Kim (2015), β -lap apresenta tempo de meia vida no plasma, quando administrada por via oral, 4,6 vezes maior do que quando administrada por via endovenosa, sugerindo que

seu uso em formulações orais é viável. Ainda vale ressaltar que um fármaco administrado por via oral oferece mais comodidade por não se tratar de uma via invasiva e não tornar necessária a internação do enfermo.

As CDs são oligossacarídeos derivados do amido e estão cada vez mais sendo usadas como adjuvantes em formulações farmacêuticas. Em nosso estudo, o número de vermes recuperados, bem como os demais parâmetros analisados mostraram que o grupo M β CD foi estatisticamente semelhante ao grupo controle, sendo possível afirmar que M β CD mostrou-se terapeuticamente inerte sobre o *S. mansoni*. As CDs são capazes de formar complexos não específicos com uma grande variedade de substratos. Na atualidade, elas vêm sendo cada vez mais empregadas pela indústria farmacêutica devido a sua capacidade complexante, que possibilita a redução de odores e sabores desagradáveis, impede interações entre medicamentos e excipientes da mesma formulação e, principalmente, aumenta a solubilidade de fármacos pouco solúveis, juntamente com o incremento da biodisponibilidade e estabilidade (SZEJTLI, 1994).

Outros trabalhos confirmam nossas observações a respeito do aumento da solubilidade da β -lap quando complexada em CDs (NASONGKLA, 2003; WANG, 2006; CAVALCANTI, 2011; TEIXEIRA, 2013). O trabalho de Freitas Neto (2012) também expõe que a solubilidade da β -lap aumenta linearmente em função da concentração de M β CD, admitindo-se uma estequiometria de 1:1 (mol:mol), β -lap:MC β D.

6.2 EFEITOS DO COMPLEXO DE INCLUSÃO β -lap:M β CD SOBRE O GRANULOMA ESQUISTOSSOMÓTIVO: ANÁLISES HISTOMORFOMÉTRICA E CONTAGEM DE GRANULOMAS

Na esquistossomose mansoni as principais intercorrências clínicas são consequência das formações granulomatosas que circundam os ovos do *S. mansoni* depositados nos tecidos do hospedeiro, principalmente no tecido hepático e intestinal, apesar de formas ectópicas serem descritas na literatura (DELMONDES *et al.*, 2014; LAMBERTUCCI, SILVA, DO AMARAL, 2007; PEREGRINO *et al.*, 2002; TRANQUILLINI *et al.*, 2011). Assim, é de suma importância que, além do surgimento de novas drogas esquistossomicidas, também surjam moléculas capazes de diminuir o número e a dimensão dos granulomas, sem que haja uma polarização da resposta imune, o que acarretaria danos teciduais ainda mais graves.

O PZQ, atual fármaco de escolha no combate ao *Schistosoma*, não é capaz de modular diretamente a resposta imunológica na infecção pelo *S. mansoni* e, conseqüentemente, diminuir os danos causados pelas formações granulomatosas. Porém, age de forma indireta, pois, após a morte dos vermes, a estimulação antigênica proveniente desse é interrompida, resultando na aceleração da cicatrização do granuloma (AIRES et al., 2012; BOTELHO et al., 2010)

Além das positivas modificações sobre os parâmetros parasitológicos, este estudo demonstrou que o complexo β -lap:M β CD, administrado por via oral, também atua sobre o granuloma esquistossomótico, reduzindo-o em número (Tabela 1) e em dimensão. Isso implica redução da fibrose hepática periportal comumente formada no decorrer da infecção (CARVALHO, MARTINS FILHO, OLIVEIRA, 2008). Uma droga capaz de abrandar a oviposição conseqüentemente irá interferir no número de formações granulomatosas, já que o ovo e seus antígenos são indispensáveis para que haja a formação do granuloma esquistossomótico.

A redução no volume médio dos granulomas pode ser um indício de que β -lap é capaz de modular a resposta imune inflamatória na esquistossomose, alterando a secreção de citocinas e acelerando o processo de cicatrização do granuloma, como pôde ser visto nos subgrupos tratados com β -lap:M β CD no 45º dia pós-infecção (Fig- 19D e E), os quais apresentaram modificação no perfil estrutural e celular, quando comparados ao controle. Estudos preexistentes mostram que β -lap atua reduzindo a síntese de IL-6, TNF- α e NO, além de reduzir o recrutamento de neutrófilos (LIU et al., 1999; TZENG et al., 2003; SITÔNIO et al., 2012); porém, é interessante que sejam feitas pesquisas mais detalhadas sobre o perfil imunológico da esquistossomose em um cenário onde a β -lap apresenta-se como agente esquistossomicida e possível imunomodulador.

A dexametasona, glicocorticoide com potencial imunomodulador, por vezes é usada como adjuvante no tratamento da esquistossomose. Na esquistossomose experimental, a dexametasona reduz níveis de IL-12, IL-4 INF- γ e aumenta os níveis de IL-10. Associada ao PZQ, pode evitar lesões graves ao hospedeiro, porém não atua como fármaco esquistossomicida (PYRRHO et al., 2002). Contrariamente, em nosso trabalho β -lap apresenta-se como imunomodulador e agente esquistossomicida.

Os ovos maduros do *S. mansoni* depositados nos tecidos do hospedeiro contêm miracídeos em seu interior que liberam antígenos essenciais à formação da resposta inflamatória granulomatosa aguda. Esses antígenos são proteínas glicosiladas e lipídeos conhecidos, de forma genérica, por SEA (*Soluble egg antigens*), que atravessam os

tecidos recrutando células e citocinas pró-inflamatórias, as quais, subsequentemente, acarretam a formação do granuloma (HAMS, AVIELLO, FALLON, 2013). As principais células componentes do granuloma são linfócitos, macrófagos, eosinófilos, fibroblastos, fibrócitos e fibras colágenas (LENZI, KIMMEL, SCHECHTMAN, 1998). Podemos observar na Figura 19 os perfis dos granulomas hepáticos encontrados nas análises do nosso experimento. Foi possível notar de forma clara a distinção entre o grupo Controle e os subgrupos tratados no 45º dia pós-infecção com β -lap:M β CD ou PZQ.

Ao longo da infecção pelo *S. mansoni* podem ser observados dois perfis imunológicos distintos, os quais podem se apresentar de forma mais evidente ou secundária, dependendo do período pós-infecção, da resposta imunológica do hospedeiro, entre outras características da relação parasito-hospedeiro. No período prepatente da fase aguda há predominância das citocinas IL-2, TNF- α e INF- γ , secreção de citrulina e óxido nítrico (NO), os quais compõem o perfil da resposta imune Th1. Após a postura dos ovos há uma inversão da resposta imune para o tipo Th2, com a secreção de IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, havendo estimulação da produção de anticorpos, principalmente IgE, aumento de eosinófilos e fibroblastos, com produção e deposição de proteínas na matriz extracelular (WYNN, CHEEVER, 1995; ABATH, 2006 *et al.*) As citocinas mediadoras da resposta Th2 estimulam a produção de colágeno e a fibrogênese, resultando na produção de tecido fibroso que culmina com a cicatrização do granuloma (CHEEVER *et al.*, 1992).

A deposição do tecido fibroso na matriz extracelular pode causar graves danos ao hospedeiro, a exemplo do achado clínico mais importante da esquistossomose mansoni: a fibrose periportal associada à perda da elasticidade e bloqueio da luz dos vasos resultando no aumento da pressão portal (JACOBS *et al.*, 1999; CARVALHO, MARTINS FILHO, OLIVEIRA, 2008). Todos esses fatores resultam no panorama clínico mais grave da fase crônica da esquistossomose mansoni, qual seja, a hipertensão portal, a qual pode levar à esplenomegalia, ascite, varizes gastroesofágicas e sangramentos gastrointestinais, sendo este responsável pelo aumento das taxas de morbidade e mortalidade entre os hospedeiros dessa verminose (GRYSEELS *et al.*, 2006)

As graves intercorrências clínicas decorrentes da formação do granuloma ao redor do ovo do *S. mansoni*, no tecido hepático, reforçam a importância de trabalhos como este, o qual visa o desenvolvimento de novos fármacos esquistosomicidas e com

potencial imunomodulador na esquistossomose. Porém, é interessante frisar que uma forte inibição da resposta imune Th2 pode levar a danos tão graves quanto à exacerbação dessa resposta (HAMS, AVIELLO, FALLON, 2013). O fato é que, ao mesmo tempo em que o granuloma causa danos ao tecido hepático, ele também protege o hospedeiro das lesões causadas pelas toxinas do ovo do *S. mansoni*.

A β -lap:M β CD administrada na fase de vermes adultos foi capaz de minimizar os danos causados pelo *S. mansoni* ao parênquima hepático, em comparação ao grupo controle, como notamos nas Figuras 18B, 18G e 18H. A diminuição das lesões presentes no parênquima hepático pode ir além da atuação durante a fase pós-postural, pois estudos mostram que animais infectados em laboratório apenas por vermes machos do schistosoma mostraram dilatação da veia porta e fibrose periportal, além de parênquima hepático com presença de macrófagos, eosinófilos difusos, fibroblastos e pigmento esquistossomótico (GRZYCH *et al.*, 1991; MUTAPI *et al.*, 2007; BOTELHO *et al.*, 2010). Logo, a morte dos vermes também seria um importante atenuante para as lesões acarretadas pela infecção.

7 CONCLUSÃO

M β CD não apresentou atividade sobre o *S. mansoni*, logo, mostrou-se inerte como agente esquistosomicida.

β -lap:M β CD 50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia apresentou ação esquistossomicida sobre esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, verme jovem e verme adulto. A duplicação da dose mostrou redução significativa na carga total de vermes e vermes fêmeas quando ambas as doses de β -lap:M β CD foram administradas no 1º, 14º, e 45º dia pós-infecção. Logo, duplicar a dose surtiu efeito satisfatório nessas três fases evolutivas, havendo uma relação dose dependente neste resultado.

Vale ressaltar que β -lap:M β CD 50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia administrada na fase de vermes jovens mostrou-se mais eficaz que o PZQ neste estágio evolutivo.

β -lap:M β CD foi capaz de reduzir o número de ovos por grama de tecido hepático nos quatros estágios evolutivos quando ambas as doses foram administradas. Também foram observadas alterações no oograma dos animais tratados no 45º pós-infecção, havendo aumento no número de ovos maduros e mortos, e redução no número de ovos imaturos, nos permitindo inferir que esta molécula atua sobre as vermes fêmeas do *S. mansoni*, interferindo na oviposição.

Foi possível evidenciar que em todos os estágios evolutivos ambas as dosagens de β -lap:M β CD levaram a redução significativa no número de granulomas presentes no tecido hepático e a consequente redução do dano tecidual. Deste modo, chegamos à conclusão que este achado também é consequência da interferência desta naftoquinona sobre a oviposição.

Ficou evidente que β -lap:M β CD causa modificações no perfil histopatológico do tecido hepático dos camundongos infectados pelo *S. mansoni*, reduzindo o infiltrado linfocitário, as áreas de necrose tecidual, além de aumentar a deposição de fibras colágenas, acelerando o processo de cicatrização das formações granulomatosas. Também concluímos que β -lap:M β CD 50mg/kg/dia e 100mg/kg/dia administrada na fase de vermes adultos, reduz significativamente o volume médio dos granulomas não sendo este resultado dose dependente. Assim, podemos atribuir estas alterações a propriedade imunomoduladora desta naftoquinona.

Por fim, nossos dados mostram que complexar β -lap em M β CD incrementou sua solubilidade e, subsequentemente, a biodisponibilidade desta molécula, possibilitando a administração por via oral e resultando na atividade esquistossomicida

encontrada neste estudo. Ao mesmo tempo, este trabalho serve como precedente para que futuras pesquisas sejam feitas com novas formulações alternativas, bem como estudos que visem delinear os mecanismos de ação da β -lap. Além disso, também oferece a possibilidade de que esta naftoquinona torne-se um protótipo para o surgimento de novos fármacos esquistosomicidas aplicáveis à terapêutica.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G. C. *et al.* Immunopathogenic mechanisms in schistosomiasis: what can be learnt from human studies? **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 2, pp. 85-91, 2006.
- ABDUL-GHANI R.; LOUTFY N.; SAHN A. E.; HASSAN, A. Current chemotherapy arsenal for *Schistosomiasis mansoni*: alternatives and challenges, **Parasitol Research**, v. 10, pp. 955–965, 2009.
- AHSAN, F.; ARNOLD, J. J.; MEEZAN, E.; PILLION, D. J. Inibição mútua da insulina propriedades de dodecyl-maltoside e dimetil-beta-ciclodextrina a seguir à administração nasal de aumento de absorção. **Pharm Res**, 2001.
- American Pharmaceutical Association. **Handbook of pharmaceutical excipients**. 5th.ed. London: Pharmaceutical Press; p. 918, 2006.
- 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. 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**, v.14, pp. 1145–1149, 2004.
- ANDRE, Z.A. A esquistossomose no Brasil após quase um século de pesquisas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, pp. 509-513, 2002.
- AULTON, M. E Pré-formulação farmacêutica. *In*: **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
- AIRES, A. de L.; XIMENES, E. C. P. A.; SILVA, R. A. R.; BARBOSA, V. X.; GÓES, A. J. das; PEIXOTO, C. A.; SOUZA, V. M. O.; ALBUQUERQUE, M. C. P. de A. Ultrastructural analysis of β -lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Exp. Parasitol.**, v. 142, pp. 83-90, 2014.
- AIRES, A. L.; de AZEVEDO A. M. C. P.; SILVA, R. A. R.; SCHIRATO, G. V.; de PONTES FILHO, N. T.; de ARAÚJO, S. B.; MALAGUEÑO, E. Immunohistopathological changes in murine *Schistosomiasis mansoni* under the influence of N-acetyl-L-cysteine. **Parasitology Research**, v. 111, n. 4, pp. 1569-1578, 2012.
- AIRES, A. L; XIMENES, E. C. P. A.; BARBOSA, V. X.; da SILVA GÓES, A. J.; SOUZA, V. M. O.; de AZEVEDO A. M. C. P. β -Lapachone: a naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, pp. 261-267, 2014.
- ARAÚJO, N.; KOHN, A.; OLIVEIRA, Á. A. D.; KATZ, N. *Schistosoma mansoni*: the action of lovastatin on the murine model. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 1, pp. 35-38, 2002.
- BARBOSA, C. S. *et al.* **Guia para vigilância e controle da Esquistossomose**: práticas de laboratório e campo. 4ª ed., Recife: CEPE, 2012.

BARBOSA, M. A. *et al.* Quantitative aspects of the migration and evolutive *Schistosoma mansoni* on mice. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 20, pp. 121-132, 1978.

BARRETO, L. C. L. S.; FILHO, M. S. S. C. Ciclodextrina: Importante excipiente farmacêutico funcional. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 4, pp. 629-636, 2008.

BEIG, A.; AGBARIA, R.; DAHAN, A. Oral delivery of lipophilic drugs: The tradeoff between solubility increase and permeability decrease when using cyclodextrin-based formulations. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e68237, 2013.

BERGQUIST, N.R.; LEONARDO, L.R.; MITCHELL, G.F. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? **Trends Parasitol.**, v. 21, pp. 112-117, 2005.

BERTÃO, H. G.; SILVA, R. A. R.; PADILHA, R. J. R.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Parasitology Research**, v. 110, pp. 2465-2473, 2012.

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. An NQO1- and PARP-1-mediated cell death pathway induced in non-small-cell lung cancer cells by beta-lapachone. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 28, pp. 11832-11837, 2007.

BONESSO-SABADINI, P.I.; DE SOUZA DIAS, L.C. Altered response of strain of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, pp. 381-385, 2002.

BOTELHO, M. C.; OLIVEIRA, P. A.; VIEIRA, P.; DELGADO, M. D. L.; LOURENÇO, L.; LOPES, C.; CORREIA DA COSTA, J. M. Granulomatous-like immune reaction and hepatic fibrosis induced by *Schistosoma haematobium* immature worms. **Virulence**, v. 1, n. 3, pp. 123-129, 2010.

BOTROS, S.; WILLIAM, S.; HAMMAM, O.; ZIDEK, Z.; HOLY, A. Activity of 9-(S)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl] adenine against *Schistosomiasis mansoni* in mice. **Antimicrobial. Agents. Chemother.**, v. 47, pp. 3853-3858, 2003.

BRANDÃO, F. C.; TAGIARI, M. P.; SILVA, M. A. S.; BERTI, L. F.; STULZER, H. K. Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control. **Pharmac. Chem. J.**, v. 42, n. 6, pp. 368-76, 2008.

BRANDAO, H. N. *et al.* Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Quím. Nova.**, vol. 33, n.6, pp. 1359-1369, 2010.

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.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância em Doenças Transmissíveis. **Plano integrado de ações estratégicas de eliminação da hanseníase, filariose, esquistossomose e oncocercose como problema**

de saúde pública, tracoma como causa de cegueira e controle das geohelmintíases: Plano de ação 2011-2015. Brasília: Ministério da Saúde, 100 p. Il, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância em Doenças Transmissíveis. **Informe Técnico “Campanha Nacional de Hanseníase, Verminoses, Tracoma e Esquistossomose 2015”**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica**. 2ª ed. Brasília, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Vigilância da Esquistossomose Mansoní**: diretrizes técnicas. 4ª ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde, Relatório de Situação, Pernambuco**. 5ª ed., Brasília. 2011.

BRASIL. **Schistosoma mansoní e esquistossomose**: uma visão multidisciplinar. Organizado por Omar dos Santos Carvalho, Paulo Marcos Zech Coelho e Henrique Lenzi. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008.

BRENER, Z. Esquistossomose experimental. **Rev. bras. Malar.**, 11:473-506, 1959.

BRUNET, L. R.; FINKELMAN, F. D.; CHEEVER, A. W.; KOPF, M. A.; PEARCE, E. J. (1997). IL-4 protects against TNF-alpha-mediated cachexia and death during acute schistosomiasis. **J. Immunol**, v. 159, pp. 777–785, 2004.

BUHA, S. M.; BAXI, G. A.; SHRIVASTAV, P. S.. Liquid Chromatography Study on Atenolol- β -Cyclodextrin Inclusion Complex. **ISRN Analytical Chemistry**, pp. 1-8, 2012.

BURKE, M.L.; JONES, M.K.; GOBERT, G.N.; LI, Y. S.; ELLIS M.K.; MCMANUS D.P.. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol.**, v. 31(4), pp. 163-76, 2009.

BUTTERWORTH, A. E. *et al.* Immunity after treatment of human *Schistosomiasis mansoní*. II. Identification of resistant individuals, and analysis of their immune responses. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, pp. 393-408, 1985.

CAFFREY, C.R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Curr. Opin. Chem. Biol.** v. 11, pp. 433–439, 2007.

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**, pp. 19–23, 2008.

CANNAVÀ, C.; CRUPI, V.; FICARRA, P.; GUARDO, M.; MAJOLINO, D.; STANCANELLI, R.; VENUTI, V. Physicochemical characterization of coumestrol/ β -cyclodextrins inclusion complexes by UV-vis and FTIR-ATR spectroscopies. **Vib. Spectrosc.**, v. 48, p. 172–178, 2008.

CARVALHO, A.T.; MARTINS FILHO A.O.; OLIVEIRA, R.C.. A resposta Imune na Forma Crônica da Esquistossomose Mansonii. In: CARVALHO O.S., COELHO P.M.Z.; LENZI H.L., (editores). **Schistosoma mansonii e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. 20ª ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 670-716, 2008.

CASTRO, N.; MEDINA, R.; SOTELO, J.; JUNG, H.; *et al.* Bioavailability of praziquantel increases with concomitant administration of food. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 44, pp. 2903–4, 2000.

CAVALCANTE, F. A.; SILVA, J. L. V.; CARVALHO, V. M. N.; CAMARA, C. A., SILVA, T. M.; PINTO, A. C; *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.**, v. 18, pp. 183–189, 2008.

CAVALCANTI, I. M.; MENDONÇA, E. A.; LIRA, M. C.; HONRATO, S. B.; CAMARA, C. A.; AMORIM, R. V.; ... & SANTOS-MAGALHÃES, N. S. The encapsulation of β -lapachone in 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex into liposomes: a physicochemical evaluation and molecular modeling approach. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, pp. 332-340, 2011.

CAVALCANTI, M. G.; FERNANDES, E. F.; CARVALHO, M. A.; *et al.* Imunologia. In: HUGGINS D. W.; SIQUEIRA-BATISTA R.; MEDEIROS L. B.; *et al.* (editores). **Esquistossomose mansonii**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., pp. 33-8, 1998.

CHEEVER, A.W. **Conditions affecting the accuracy of potassium hydroxide digestion techniques for counting *Schistosoma mansonii* eggs in tissues**. Bull. World. Health. Organ. v. 39, pp. 328–331, 1968.

CHAI J. Y. Praziquantel treatment in trematodes and cestode infections: an update. **Infect. Chemother.**, v. 45, pp. 42-43, 2013.

CHEEVER, A. W.; FINKELMAN, F. D.; CASPAR, P.; HEINY, S.; MACEDONIA, J. G.; SHER, A. Treatment with anti-IL-2 antibodies reduces hepatic pathology and eosinophilia in *Schistosoma mansonii* – infected mice while selectively inhibiting T cell Il-5 production. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 148, pp. 3244- 3248, 1992.

CHEN, S.; YUEH, M. F.; BIGO, C.; BARBIER, O.; WANG, K.; KARIN, M.; ... & TUKEY, R. H. Intestinal glucuronidation protects against chemotherapy-induced toxicity by irinotecan (CPT-11). **Proc. Natl. Acad. Sci., U S A**, 2013.

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

CHRISTOPHERSON, J. B. The successful use of antimony in bilhaziasis. **Lancet**, v. 2, p. 325, 1918.

CLAESSENS, S.; HABONIMANA, P.; KIMPE, N. Synthesis os naturally occurring naphthoquinone epoxides and application in the synthesis of β -lapachone. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 8, pp. 3790-3795, 2010.

CIMERMAN, B.; CIMERMAN, S. **Parasitologia humana e seus fundamentos gerais**, 2ª ed. São Paulo, Editora Atheneu, 2001.

CIOLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. **Parasitology Today**, v. 14, n. 10, pp. 418-422, 1998.

CIOLI, D.; BOTROS, S. S.; WHEATCROFT-FRANCKLOW, K.; MBAYE, A.; SOUTHGATE, V.; TCHUENTÉ, L. A. T., ... & ALBIN, J. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, pp. 979-987, 2004.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present, future? **Pharmac. Ther.** v. 68, n. 1, pp. 35-85, 1995.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Drug resistance in schistosomes. **Parasitology Today**, v. 9, n. 5, pp. 162-166, 1993.

COELHO, M. V. Aspectos do desenvolvimento das formas larvais de *Schistosoma mansoni* em *Australorbis nigricans*. **Rev. bras. Biol.**, v. 17, pp. 325-37, 1957.

COLES, G.C. Drug resistance and drug tolerance in parasites. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 8, pp. 348, 2006.

COULIBALY, J. T.; N'GBESSO, Y. K.; KNOPP, S.; KEISER, J.; N'GORAN, E. K.; UTZINGER, J. Efficacy and safety of praziquantel in preschool-aged children in an area endemic for *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 6, n. 12, pp. 1917, 2012.

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

COUTO, F.F.; COELHO, P.M.; ARAÚJO, N.; KUSEL, J.R.; KATZ, N.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; MATTOS, A. C. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 106, pp. 153-157, 2011.

COUTO, J. L. A. Esquistossomose mansoni em duas mesorregiões do Estado de Alagoas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, n. 4, 2005.

CUNHA-FILHO, M. S. S. **Beta-lapachona:** Estudios de preformulación y Aproximaciones tecnológicas para su formulación. Tesis Doctoral Universidad de Santiago de Compostela, España. 2007.

CUNHA-FILHO M. S. S.; DACUNHA-MARINHO B., TORRES- LABANDEIRA JJ, MARTINEZ-PACHECO R, LANDIN M. Characterization of β -lapachone and methylated β -cyclodextrin solid-state systems. **AAPS Pharm Sci Tech.**, v. 8, n. 3, pp. E68-E77, 2007.

CUNHA-FILHO, M. S. S.; MARTÍNEZ-PACHECO, R.; LANDIN, M.. Effect of storage conditions on the stability of β -lapachone in solid state and in solution. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 65, n. 6, pp. 798-806, 2013.

CRAMER, F.; SAENGER, W.; SPATZ, H.-Ch. Inclusion compounds. XIX. 1a The formation of inclusion compounds of α -cyclodextrin in aqueous solutions.

Thermodynamics and kinetics. **Journal of the American Chemical Society**, v. 89, n. 1, pp. 14-20, 1967.

D'ALBUQUERQUE, I. L. Termorreação da 2-hidróxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona. **Revista do Instituto de Antibióticos**. Recife/UFPE, v. 8, n. 1, pp. 73-87, 1968.

DANSO-APPIAH, A.; DE VLAS, S. J. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. **Trends Parasitol.**, v. 18, pp. 125–129, 2002.

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**, v. 57, pp. 773-779, 1979.

DAVIS, B.H.; KRESINA, T.F..Hepatic fibrogenesis.**Clin. Lab. Med.**, v.16, n.2, pp.361-375, 1996.

DAVIS, M. E.; BREWSTER, M. E. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 12, pp. 1023-1035, 2004.

DELMONDES, L. M.; CRUZ, M. A. F.; GUIMARÃES, M. K. H.; SANTANA, L. G.; GONÇALVES, V. P. C.; BRITO, H. L. DE F. Esquistossomose endocervical: relato de caso. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.**, Rio de Janeiro , v. 36, n. 6, p. 276-280, 2014 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-72032014000600276&lng=en&nrm=iso>. Acessado em 06 setembro de 2016.

DEORSOLA, A. C.; MOTHÉ, C. G.; OLIVEIRA, L. G.; DEORSOLA, A. B. Technological monitoring of cyclodextrin – World panorama. **World Patent Information**, v. 39, pp. 41-49, 2014.

Do CAMPO, R.; LOPES, J. N.; CRUZ, F. S.; SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by beta-lapachone. **Exp. Parasitol.**, v. 42, n. 1, pp. 142-9, 1977.

DOENHOFF, M. J. Is schistosomicidal chemotherapy sub-curative? Implications for drug resistance. **Parasitol. Today**, v.14, pp. 434–435, 1998.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21, pp. 659–67, 2008.

DONG-OH, M.; CHOI, Y. H.; KIM, N. D.; PARK, Y. M.; KIM, G. Y. Anti-inflammatory effects of β -lapachone in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia. **International Immunopharmacology**, v. 7, pp. 506–514, 2007.

D'SOUZA, V. T.; LIPKOWITZ, K. B.; Cyclodextrins: introduction. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, pp. 1741-1742, 1998.

DUVAL, R. H.; DEWITT, W. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 16, pp. 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.**, v. 64, pp. 111-113, 1947.

EFFERTH, T.; LI, P. C.; KONKIMALLA, V. S. B.; KAINA, B. From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. **Trends in molecular medicine**, v. 13, n.8, pp. 353-361, 2007.

EL-RIDI, R., OZAKI, T., INABA, T., ITO, M., & KAMIYA, H. *Schistosoma mansoni* oviposition in vitro reflects worm fecundity in vivo individual, parasite age and host dependent variations. **Int. J. Parasitol.**, v. 27, pp. 381-7, 1997.

EL-BESHBISHI, S. N.; TAMAN, A.; EL-MALKY, M.; AZAB, M. S.; EL-HAWARY, A. K.; EL-TANTAWY, D. A. In vivo effect of single oral dose of artemether against early juvenile stages of *Schistosoma mansoni* Egyptian strain. **Experimental parasitology**, v. 135, n. 2, pp. 240-245, 2013.

ERKO, B.; DEGAREGE, A.; TADESSE K.; MATHIWOS A.; LEGESSE, M. Efficacy and side effects of praziquantel in the treatment of *Schistosomiasis mansoni* in schoolchildren in Shesha Kekele elementar school, Wondo Genet, Southern Ethiopia. **Asian. Pacific. J. Trop. Biomed**, pp. 235–239, 2012.

FALLON, P. G.. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunol. Today**, v. 21, pp. 29–35, 2000.

FALLON, P. G.; STURROCK, R. F.; NIANG, A. C.; DOENHOFF, M. J. Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, pp. 61–62, 1994.

FAVRE, T. C.; PIERI, O. S.; BARBOSA, C. S.; BECK, L. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, pp. 569-76, 2001.

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 Quím.**, v. 2, pp. 140-160, 2010.

FERREIRA, S. B.; SALOMÃO, K.; SILVA, F. C.; PINTO, A.V.; KAISER, C. R.; PINTO, A. C.; FERREIRA, V. F.; CASTRO, S. I. Synthesis nadanti-*Trypanosoma cruzi* activity of β -lapachone analogues. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, pp. 3071–3077, 2011.

FREITAS-NETO, J. L.; PRESMICH, G. M. A.; ROLIM, L. A.; ALVES L. D. S; ALBUQUERQUE, M. M; ROLIM-NETO, P. J. Caracterização físico-química do potencial agente antineoplásico β -lapachona. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Appl.**, v. 33, pp. 545-553, 2012.

FROHBERG, H. Results of toxicological stualies on praziquantel.. **Drur. Res.**, pp. 1137 - 1144, 1984.

GARBA, A.; LAMINE, M. S.; DJIBO, A. *et al.* Safety and efficacy of praziquantel syrup (Epiquantel®) against *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni* in preschool-agedchildren in Niger. **Acta. Trop.**, 2012.

GONNERT, R.; ANDREWS, P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Parasitology Research**. v. 52, pp. 129-150, 1977.

GREENBERG, R. M. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes. **Parasitology**. v. 140, pp. 1534–1546, 2013.

GREENBERG, R. M. Schistosome ABC multidrug transporters: From pharmacology to physiology. **Int. J. Parasitol. Drugs. Resist.**, v. 4, pp. 301–309, 2014.

GROLIG, J.; WAGNER, R. Naphthoquinones. *In: Ullmann's encyclopedia of industrial chemistry*. Wiley-VCH, Weinheim, 2005.

GRYSEELS, B. Schistosomiasis. **Infect. Dis. Clin. N. Am.**, v. 26, pp. 383-397, 2012.

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.**, v. 6, pp. 864-873, 2001.

GRYSEELS, B.; POLMAN K.; CLERINX, J.; KESTENS, L. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, pp. 1106–1118, 2006.

GRZYCH J. M.; PEARCE E.; CHEEVER A.; CAULADA Z. A.; CASPAR P.; HEINY S. *et al.* Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine *Schistosomiasis mansoni*. **Immunol**, v. 146, pp. 1322-1327, 1991.

GUIMARÃES, R. J. P.S.; FREITAS, C. C.; DUTRA, L.V.; SHIMABUKURO, Y. E.; FONSECA, F. R.; MARTINS, F. T.; MOURA, A. C. M.; AMARAL, R. S.; DRUMMOND, S. C.; SCHOLTE, R. G. C.; CARVALHO, O. S. Utilização do modelo de mistura espectral do sensor MODIS no estudo da distribuição da esquistossomose e de *Biomphalaria glabrata* no Estado de Minas Gerais. *In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO*, 2007, Florianópolis. **Anais**. Florianópolis, 2007, v. 18, pp. 2967-2703.

GUSTAVSON, S.; ZOUAIN, C. S.; ALVES, J. B.; LEITE, M. F.; GOES, A. M.. Modulation of granulomatous hypersensitivity against *Schistosoma mansoni* eggs in mice vaccinated with culture-derived macrophages loaded with PIII. **Parasitol. Int.**, v. 51, pp. 259-269, 2002.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P.G. The *Schistosoma* Granuloma: friend or foe? **Front. Immunol.**, v. 4, p. 89, 2013 Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2013.00089>>. Acessado: 29 fev. 2016.

HANG, L. M.; WARREN, K. S.; BOROS, D. L. *Schistosoma mansoni*: antigenic secretions and the etiology of egg granulomas in mice. **Exp. Parasitol.**, v. 35, pp. 288-298, 1974.

HIRSCH, C.; CARVALHO QUEIROZ, C.; FRANCO, G. R.; PENA, S. D.; SIMPSON, A. J.; GOES, A. M.. Evidentiation of paramyosin (Sm-97) as a modulating antigen on granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* eggs. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 92, pp. 663-667, 1997.

HOFFMANN, W. A.; PONS, J. A.; JANER, J. L. **Sedimentation concentration method in schistosome.**, Porto Rico, 1934.

HOOKE, S. C. The Constitution of "Lapachic Acid" (Lapachol) and Its Derivatives. **J. Chem. Soc.**, London, v.61, p. 611, 1892.

HOOKE, S. C. Constituion of lapachol and its derivatives. **J. Chem. Soc. Transactions**, v. 69, p. 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.**, v. 58, p. 1181, 1936.

HOTEZ, P.J.; KAMATH, A. **Neglected tropical diseases in Sub-Saharan Africa:** Review of their prevalence, distribution, and disease burden. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, 3, p. e412, 2009

ISMAIL, M.; METWALLY, A.; FARGHALY, A.; BRUCE J.; TAO, L. F.; BENNETT, J. L. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, pp. 214–218, 1996.

ISMAIL, M. M.; TAHA S. A.; FARGHALY A. M.; EL-AZONY, A. S. Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. **J. Egypt. Soc. Parasitol.**, v. 24, pp. 685–695, 1994.

JERNIGAN, J. A.; PEARSON, R. D..Antiparasitic agents. *In*: MANDELL D. A., DOUGLAS G., BENNET J. E., *et al.*(editores). **Principles and practice of infectious diseases**. 4^a ed. New York: Churchill Livingstone; 1995. p. 1235-44.

JEZIORSKI, M. C.; GREENBERG, R. M. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: potential role in praziquantel action. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, pp. 625–632, 2006.

JEZIORSKI, M. C.; GREENBERG, R. M. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: potential role in praziquantel action. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, pp. 625–632, 2006.

JORDAN, P.; WEBBE, G. (Ed.). **Schistosomiasis:** epidemiology, treatment and control. London: William Heinemann Medical Books, 361.

JUN, S. W.; MIN. S.; KIM, M. S.; KIM, J. S.; PARK, H. J.; LEE, S.; WOO, J. S.; HWANG, J. S. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- β -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 66, pp. 413–421, 2007.

JURBERG, A. D.; GONÇALVES, T.; COSTA, T. A.; DE MATTOS, A. C.; PASCARELLI, B. M.; DE MANSO, P. P.; RIBEIRO-ALVES, M.; PELAJOMACHADO, M.; PERALTA J. M.; COELHO P. M.; LENZI, H. L. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. **Dev Genes Evol.**, v. 219, pp. 219-234, 2009.

KATZ N.; COELHO, P. M. Z.. Clinical therapy of *Schistosomiasis mansoni*: The Brazilian contribution. **Acta Trop.**, v.108, pp. 72-78, 2008.

KATZ, E.; ITAMAR, W. Integrated nanoparticle–biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. **An gewandte Chemie International**, ed. 43., v. 45, pp. 6042-6108, 2004.

KATZ, N.; PEIXOTO, S.V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev. da Soc. Brasil. de Med. Trop.**, v. 33, pp. 303-308, 2000.

KATZ, N. **The discovery of *Schistosomiasis mansoni* in Brazil**. *Acta Trop.*, v. 108, n. 2-3, pp. 69-71, 2008.

KATZ, N.. Terapêutica Clínica da Esquistossomose Mansonii. In: CARVALHO, O. S.; *et al.* (Ed.). ***Schistossoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro, pp. 850-856, 2008.

KATZ, N.; COELHO, P. M. Z. Clinical therapy of *Schistosomiasis mansoni*: The Brazilian contribution. **Acta. Trop.**, v. 108, pp. 72-8, 2008.

KATZ, N.; DIAS, L. C. S. Esquistossomose mansoni em parasitologia humana e seus fundamentos gerais. **Editora Atheneu**, 1999.

KLAVER, E.J.; KUIJK, L.M.; LINDHORST, T.K.; CUMMINGS, R.D.; VAN, D. I. E. I. *Schistosoma mansoni* soluble egg antigens induce expression of the negative regulators SOCS1 and SHP1 in human dendritic cells via interaction with the mannose receptor. **PLoS One**, 2015, 10: e0124089. Disponível em:<<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0124089>>. Acessado: 03 mar. 2016.

KAUKONEN, A. M.; KILPELAINEN, I.; MANNERMAA, J. P. Watersoluble β -cyclodextrins in paediatric oral solutions of spironolactone: Solubilization and stability of spironolactone in solutions of β -cyclodextrin derivatives. **Int. J. Pharm.**, v.159, pp. 159–170, 1997.

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.** v. 21, pp. 2117–2122.

KIM, I.; KIM, H.; RO, J.; JO, K.; KARKI, S.; KHADKA, P.; ... & LEE, J. Preclinical Pharmacokinetic Evaluation of β -Lapachone: Characteristics of Oral Bioavailability and First-Pass Metabolism in Rats. **Biomolecules & therapeutics**, v. 23, n. 3, p. 296, 2015.

LAMBERTUCCI J. R.; SILVA L. C.; do AMARAL R. S. Guidelines for the diagnosis and treatment of schistosomal myeloradiculopathy. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, pp. 574–581, 2007.

LAMBERTUCCI J. R.; SILVA L. C. S.; VOIETA, I. **Esquistossomose mansônica**. In: COURA J. R.. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v. 1, cap 76, pp. 931-946, 2005.

LAMBERTUCCI, J. R.; CARVALHO, V. T.; SILVA, L. C. Pulmonary hypertension in *Schistosomiasis mansoni*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.39, n.3, pp. 295-6, 2006.

LAWN, S. D.; LUCAS, S. B.; CHIODINI, P. L. *Schistosoma mansoni* infection: failure of standard treatment with praziquantel in a returned traveller. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 97, pp. 100–101, 2003.

LEE, J.H.; CHEONG, J.; PARK, Y.M.; CHOI, Y.H.. Down-regulation of cyclooxygenase-2 and telomerase activity by β -lapachone in human prostate carcinoma cells. **Pharmacological Research**, v. 51, pp. 553–560, 2005.

LENZI H. L.; KIMMEL E.; SCHECHTMAN H.; *et al.* Histoarchitecture of schistosomal granuloma development and involutions: morphogenetic and biomechanical approaches. **Mem Inst Oswaldo Cruz** .v. 93, n. 1, p. 141-51, 1998.

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.**, v.90, pp.1839-1842, 1993.

LIMA N. M. F.; SANTOS A. F.; PORFÍRIO Z.; GOULART M. O. F.; SANTANA AEG. Toxicity of lapachol and isolapachol and their potassium salts against *Biomphalaria glabrata*, *Schistosoma mansoni* cercariae, *Artemia salina* and *Tilapia nilotic*. **Acta Tropica**, v. 83, pp. 43-47, 2002.

LENZI, H. L.; JURBERG, A. D.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, J. A. Migração e Desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no Hospedeiro Definitivo. In: CARVALHO, O.S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. (Org.). ***Schistosoma mansoni* & Esquistossomose**: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz. Cap.3, pp 87-145, 2008.

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. Identification of nor- β -lapachone derivatives as potential antibacterial compounds against *Enterococcus faecalis* clinical strain. **Curr. Microbiol.**, v. 62, pp. 684-689, 2011.

LI, C. J.; AVERBOUKH, L.; PARDEE, A. B. Beta-Lapachone, a novel DNA topoisomerase I inhibitor with a mode of action different from camptothecin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 30, pp. 22463-22468, 1993.

LI, H. J.; WANG, W.; QU, G. L., *et al.* Effect of the in vivo activity of dihydroartemisinin against *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Parasitol. Res.**; v. 110, pp. 1725-32, 2012

LICHTENBERGOVA, L.; KOLBEKOVA, P.; KOURILOVA, P. *et al.* Antibody responses induced by *Trichobilharzia axei* antigens in murine and human hosts exhibiting cercarial dermatitis. **Parasite. Immunol.**, v. 30 (11-12), pp. 585-95, 2008.

LIMA, C. M. B. L.; FREITAS, F. I. S.; MORAIS, L.C. S. L.; CAVALCANTI, M. G. S. SILVA; L. F. PADILHA, R. R.; BARBOSA, C. G. S.; SANTOS, F. A. B.; ALVES, L. C.; DINIZ, M. F. F. M. Ultrastructural study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after in vitro exposure to allicin. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 44, pp. 327- 330, 2011.

LIMA, O. G.; D'ALBUQUERQUE, I. L. : MACHADO M. P.; PINTO G. P.; MACIEL M. G. A new antibiotic substance isolated from Pau D'arco (tabebuia). **Anais Soc. Biol. Pernambuco**. v. 14, pp. 136-40, 1956.

LIMA G., F. de; ALVES, G. M. C.; DOS SANTOS, F. L. A.; de LIMA, L. F.; ROLIM, L. A.; NETO, P. J. R. *et al.* Ciclodextrinas: como adjuvante tecnológico para melhorar a biodisponibilidade de fármacos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, p. 3, 2008.

LIPKOWITZ, K. B. Applications of computational chemistry to the study of cyclodextrins. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, pp. 1829-1874, 1998.

LIU, S. H.; TZENG, H. P.; KUO, M. L.; LIN-SHIAU, S. Y. Inhibition of inducible nitricoxide synthase by β -lapachone in rat alveolar macrophages and aorta. **British Journal of Pharmacology**, v.126, p.746–750. Lorsuwannarat, N., Saowakon, N., Ramasoota, 1999.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 62, n. 11, pp. 1607-1621, 2010.

LOFTSSON, T.; BREWSTER, M. E. Pharmaceutical applications of cyclodextrins. Drug solubilization and stabilization. **J. Pharm. Sci.**, v. 85, pp. 1017–1025, 1996.

LOFTSSON, T. E.; DUCHENE, D. Cyclodextrins and their pharmaceutical applications. **Int. J. Pharm.**, v. 329, n. 1, pp. 1-11, 2007.

LOPES, F.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; FARINAZZO, R. J. M.; *et al.* Patologia. In: HUGGINS D. W.; SIQUEIRA-BATISTA, R.; MEDEIROS, L. B.; *et al.* (editores). **Esquistossomose mansoni**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr, p. 39-55, 1998.

LORSUWANNARAT, N.; SAOWAKON, N.; RAMASOOTA, P.; WANICHANON, C.; SOBHON, P. The anthelmintic effect of plumbagin on *Schistosoma mansoni*. **Experimental Parasitology**, v. 133, pp.18–27, 2013

LUTZ, A. **Caramujos de água doce do gênero Planorbis, observados no Brazil**. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 10, pp. 65-82, 1918.

LYRA, M. A. M.; ALVES, L. D. S.; FONTES, D. A. F.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; ROLIM-NETO, P. J. Ferramentas analíticas aplicadas à caracterização de complexos de inclusão fármaco-ciclodextrina. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 2, pp. 117–124, 2010.

MAGALHÃES, L. G.; RAO, G. S.; SOARES, I. A.; BADOCCO, F. R.; CUNHA, W. R.; RODRIGUES, V.; KAPADIA. Chemoprevention of Schistosomiasis: In vitro Antiparasitic Activity of Nineteen Plant-derived and Synthetic Simple Naphthoquinones and Naphthols against *Schistosoma mansoni* Adult Worms. **Journal of Tropical Diseases & Public Health**, v.2, n. 146, 2014, doi: 10.4172/2329-891X.1000146.

MAKIN, G.; DIVE, C. Apoptosis and cancer chemotherapy. **Trends in cell biology**, v. 11, n. 11, pp. S22-S26, 2001.

MANN, J. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 2, pp. 143-148, 2002.

- MARTINEZ, E. M.; NEVES, R. H.; OLIVEIRA, R. M. F. D.; MACHADO-SILVA, J. R.; REY, L. Características biológicas e morfológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 36, pp. 557-64, 2003.
- MATHIJSEN, R. H.; LOOS, W. J.; VERWEIJ, J.; SPARREBOOM, A. Pharmacology of topoisomerase I inhibitors irinotecan (CPT-11) and topotecan. **Current cancer drug targets**, v. 2, n. 2, pp.103-123, 2002.
- MATINS-MELO, F. R.; PINHEIRO, M. C.; RAMOS, A. N. J. R.; ALENCAR, C. H.; BEZERRA, F. S.; HEUKELBACH, J. Trends in schistosomiasis-related mortality in Brazil, 2000-2011. **Int. J. Parasitol.**, v. 44, n. 14, pp. 1055-1062, 2014.
- MATHIRON, D.; MARÇON, F.; DUBAELE, J. M.; CAILLEU, D.; PILARD, S. Benefits of methylated cyclodextrins in the development of midazolam pharmaceutical formulations. **J Pharm Sci.**, v. 102, pp. 2102-2111, 2013.
- MANTAWY, M. M.; ALI, H. F.; RIZK, M. Z. Therapeutic effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, pp.155–163, 2011.
- 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.. 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.**, v. 43, pp. 345-349, 2010.
- MELMAN, S. D.; STEINAUER, M. L.; CUNNINGHAM, C.; KUBATKO, L. S.; MWANGI, I. N.; WYNN, N. B.; MUTUKU, M. W.; KARANJA, D. M.; COLLEY, D. G.; BLACK, C. L.; SECOR, W. E.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S.. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLoS. Negl. Trop. Dis.**, v. 3, p.e504, 2009.
- MELO A. L.; COELHO P. M. Z. *Schistosoma mansoni* e a Doença. In: Neves D. P., **Parasitologia Humana**, 11ª ed. São Paulo: Atheneu, cap. 22, pp. 193-212, 2005.
- 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**, v. 101, pp. 895–905, 2007.
- MILAN E. P.; KEIM L. S. Esquistossomíase mansônica. In: TAVARES, W., MARINHO, L. A. C.; (editores). **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. 2ª ed. São Paulo: Atheneu; 2007.
- 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** v.13, pp. 481-488, 2010.
- MOORE, Z.; CHAKRABARTI, G.; LUO, X.; ALI, A.; HU, Z.; FATTAH, F. J.; BOOTHMAN, D. A. NAMPT inhibition sensitizes pancreatic adenocarcinoma cells to

tumor-selective, PAR-independent metabolic catastrophe and cell death induced by β -lapachone. **Cell death & disease**, v.6, n.1, p. 1599, 2015.

MOSHER, G.; THOMPSON, D.O. Complexation and cyclodextrins. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**., pp. 531-558, 2002.

MOURA, A.C. M.; FREITAS, C. R.; DUTRA, L. V.; MELO, G. R.; CARVALHO, O. S.; FRITAS, C. C.; AMARAL, R. S.; DRUMMOND, S. C.; SCHOLTE, R. G. C.; GUIMARÃES, R. J. P. S. Atualização de mapa de drenagem como subsídio para a montagem do SIG para a análise da distribuição da esquistossomose em Minas Gerais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE SENSORIAMENTO REMOTO, 2005, Goiânia. **Anais...** Goiânia, v. 16, 2005.

MOSTERT, S.; PETZER, A.; PETZER, J. P. Evaluation of Natural and Synthetic 1,4-naphthoquinones as inhibitors of Monoamine Oxidase. **Chemical Biology & Drug Design**, v.87, pp. 737-746, 2016. DOI:10.1111/cbdd.12708

MÜLLER, K., SELLMER, A.; WIEGREBE, W. Potential antipsoriatic agents: lapachol compounds as potent inhibitors of HaCaT cell growth. **J. Nat. Prod.**, v. 62, pp. 1134-1136, 1999.

MUTAPI F.; WINBORN G.; MIDZI N.; TAYLOR M.; MDULUZA T.; MAIZELS R. M. Cytokine responses to *Schistosoma haematobium* in a Zimbabwean population: contrasting profiles for IFN- γ , IL-4, IL-5 and IL-10 with age. **BMC Infect Dis.** v. 7, p. 139, 2007.

NASONGKLA, N.; WIEDMANN, A. F.; BRUENING, A.; BEMAN, M.; RAY, D.; BORNMANN, W. G.; BOOTHMAN, D. A.; GAO, J. Enhancement of solubility and bioavailability of beta-lapachone using cyclodextrin inclusion complexes. **Pharm Res** v. 20, pp. 1626–1633, 2003.

NIOI, P.; HAYES, J. D. 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.**, v. 555, pp. 149-171, 2004.

OLLIARO, P.; DELGADO-ROMERO, P.; KEISER, J. The little we know about the pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel (racemate and R-enantiomer). **J.Antimicrob.Chemother.**, v. 69, pp. 863–870, 2014.

OLLIARO, P.; DELGADO-ROMERO, P.; KEISER J. The little we know about the pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel (racemate and R-enantiomer). **J.Antimicrob.Chemother.**, v. 69, pp. 863–870, 2014.

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

PARAENSE, W. L. Histórico do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P.M.Z.; LENZI, H.L. (Org.). **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. Cap. 1. pp. 31-41.

PARK, H. J.; AHN, K. J.; AHN, S. D.; CHOI, E.; LEE, S. W.; WILLIAMS, B.; GAO, J. Susceptibility of cancer cells to β -lapachone is enhanced by ionizing radiation. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.**, v. 61, pp. 212–219, 2005.

PATERNÒ, E. Ricerche sull'acido lapacico. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 12, pp. 337-392, 1882.

PARISE-FILHO R. P.; SOUZA T. M.; ARAÚJO M. B.; FERNANDES N. A.; SILVEIRA A. M. B. Análise químico-farmacêutica da oxamniquina e de suas especialidades farmacêuticas. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 37, n. 1, pp. 61-72, 2001.

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. Ver. Immunol.**, v. 2(7), pp. 499-511, 2002.

PEREGRINO, A. J. P.; PUGLIA, P. M. K.; BACHESCHI, L. A.; HIRATA, M. T. A.; BROTTTO, M. W. I.; NÓBREGA, J. P. S.; SCAFF, M. Diagnosis of schistosomiasis of the spinal cord: contribution of magnetic resonance imaging and electroneuromyography. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 60, n. 3A, pp. 597-602, 2002.

PELLEGRINO J.; KATZ, N.. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni. **Adv. Parasitol.**, v. 6, pp. 233-90, 1968.

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.** v. 11, pp. 201-215.

PELLEGRINO, J.; OLIVEIRA, C. A.; FARIA, J.; CUNHA, A. S. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 11, n. 2, p. 201-215, 1962.

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

PEPE, M. S.; CARVALHO, O. S.; CALDEIRA, R. L.; PASSOS, L. K. J.; MULLER, G.; RODRIGUES, A. P.; AMARAL, H. L. C.; BERNE, M. E. A. Identificação de Espécies de *Biomphalaria* (Gastropoda: Planorbidae) na Região Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. In: Congresso de Iniciação Científica da UFPEL, 15., Pelotas, 2006. **Anais...** Pelotas: Editora da UFPEL, 2006.

PÉREZ-SACAU, E.; ESTÉVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A. G.; GUTIÉRREZ, Y. D.; GIMÉNEZ, T. A. Antiplasmodial activity of naphthoquinones related to lapacholand beta-lapachone. **Chem Biodivers**, v. 2, pp. 264-274, 2005.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde (Pernambuco). Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Esquistossomose e geo-helmintíases**: relatório das condições de Saneamento das áreas/localidades hiperendêmicas em Pernambuco. Recife: Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco; p.134, 2013.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Relatório de Gestão do SANAR** - Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas, 2011 – 2014. Recife: Secretaria Estadual de Saúde, 2014.

PERNAMBUCO. Secretaria Estadual de Saúde. Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde. **Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose - SIS-PCE**. Versão 4.1. Recife, 2015.

PESSOA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1988.

PHILLIPS, S. M.; DICONZA, J. J.; GOLD, J. A.; REID, W. A. Schistosomiasis in the congenitally athymic (nude) mouse. I. Thymic dependency of eosinophilia, granuloma formation, and host morbidity. **J. Immunol.**, v. 118, pp. 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.**, v. 34, pp. 527–533, 2004.

PINTO, A. V.; CASTRO, S. L. (2009) The Trypanocidal Activity of Naphthoquinones: A Review. **Molecules**, v. 14, pp. 4570–4590 40.

PINTO, A. V.; PINTO, M. C. R.; GILBERT, B.; PELLEGRINO, J.; MELLO R. T.. *Schistosoma mansoni* blockage of cercarial skin penetration by chemical agents: I. Naphthoquinones and derivatives. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 71, pp. 133–135, 1977.

POMMIER, Y.. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, pp. 789–802, 2006.

PRATA, A. **Esquistossomose Mansonii**. In: Veronesi, R.; Veronesi, F. R. (editor). Tratado de infectologia. 3^a ed., São Paulo: Atheneu; 2007.

RAO, K. V.; MCBRIDE, T. J. OLESON, J. J. Recognition and evaluation of lapachol as an antitumor Agent. **Cancer Research**. v. 28, pp. 1952– 1954, 1968.

RAMIREZ, B. 2012; BICKLE, Q.; YOUSIF, F.; FAKOREDE, F.; MOURIES, M.A.; NWAKA, S. Schistosomes: challenges in compound screening. **Expert Opinion Drug Discovery**. v. 2, n. 1, pp. S53–S61, 2007.

RESSURREIÇÃO, M.; KIRK, R. S.; ROLLINSON, D.; EMERY, A. M.; PAGE, N. M.; WALKER, A. J. Sensory protein Kinase Signaling in *Schistosoma mansoni* cecariae: Host Location and Invasion. **J. Infect. Dis.**, v. 212, pp. 1787–1797, 2015.

REY, L. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis transmission in Brazil. **Res. Rev. Parasitol**, v. 52, 1993.

REY, L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomíase: O Parasito. In: **Parasitologia**. 3^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. v. 856, pp. 413–425, 2001.

REY; L. **Bases da parasitologia médica**. 2^a ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

RIBEIRO, F.; VIEIRA, C. dos S.; FERNANDES, A.; ARAUJO, N.; 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**, v. 35, p. 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**, v. 111, pp. 44-50, 2009.

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

RODRIGUES, S. G.; DE SOUZA CHAVES, I.; DE MELO, N. F. S.; DE JESUS, M. B.; FRACETO, L. F.; FERNANDES, S. A.; PINTO, L. D. M. A. Computacional analysis and physico-chemical characterization of an inclusion compound between praziquantel and methyl-cyclodextrin for use as an alternative in the treatment of schistosomiasis. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 70, n. 1, pp.19-28, 2011.

ROFATTO, H. K.; LEITE, L. C., TARARAM, C. A.; KANNO, A. I.; MONTTOYA, B. O.; FARIAS, L. P.. Antígenos vacinais contra esquistossomose mansônica: passado e presente. **Rev. Biol.**, v. 6b, pp. 54-9, 2011.

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**, v. 346, pp. 1212–20, 2002.

ROSS, A. G.; VICKERS, D.; OLDS, G. R.; SHAH, S. M.; MCMANUS, D.P.. Katayama Syndrome. **Lancet Infect.Dis.**, 2007: 7.

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

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**, v. 16, pp. 668-674, 2008.

SANTOS, A. T.; BLAS, B. L.; NOSENAS, J. S.; PORTILLO, G. P.; ORTEGA, O. M.; HAYASHI, M.; BOEHME, K. Preliminary clinical trials with praziquantel in *Schistosoma japonicum* infections in the Philippines. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 57, pp. 793-799, 1979.

SANTOS, C. dos; BUERA, M. P.; MAZZOBRE, M. F. Influence of ligand structure and water interactions on the physical properties of β -cyclodextrins complexes. **Food chemistry**, v. 132, n. 4, pp. 2030-2036, 2012.

SANTOS, C dos.; BUERA, P.; MAZZOBRE, M. F. Procedia phase solubility studies of terpineol with β -cyclodextrins and stability of the freeze-dried inclusion complex. **Food Sci**, v. 1, pp. 355-62, 2011.

SANTOS, E. V. M.; CARNEIRO, J. W. M.; FERREIRA, V. F. Quantitative structure-activity relationship in aziridiny-1,4-naphthoquinone antimalarials: study of theoretical correlations by the PM3 method. **Bioorg. Med. Chem.**, v.12, pp. 87-93, 2004.

SANTOS P., A.; RAMOS, J. A.; NETO, R. M.; DA SILVA, C. S.; LENZI, H. L.; TAKIYA, C. M.; GATTASS, C. R. Dexamethasone, a drug for attenuation of *Schistosoma mansoni* infection morbidity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, pp. 3490-3498, 2002.

SCHUERCH, A. R.; WEHRLI, W. β -lapachone, an inhibitor of oncornavirus Reverse transcriptase and Eukaryotic DNA polymerase α . Inhibitory effect, thiol dependence and specificity. **Eur. J. Biochem.**, v. 84, pp. 197-205, 1978.

Schistosomiasis. Fact Sheet no. 115; **World Health Organization**: Geneva, February, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115>>. Acesso em: 16 fev. 2016.

SICARD, P.; SAINÉZ, M. Biosynthesis of cycloglycosyltransferase and obtention of its enzymatic reaction products. In: **DUCHÊNE, D.**, ed. Cyclodextrins and their industrial uses. Paris: Editions Santé, pp. 77-103, 1987.

SILVA, J. L.; MESQUITA, A. R. C.; XIMENES, E. A. In vitro synergic effect of β -lapachone and isoniazid on the growth of *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium smegmatis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 4, pp. 580-582, 2009.

SILVA, M. N.; FERREIRA, V. F.; SOUZA, M.C.B.V.. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β -lapachona e derivados. **Quim. Nova**, v. 26, pp. 407-416, 2003.

SILVA, P. C. V.; DOMINGUES, A. L. C. **Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil**. Epidemiologia e Serviço de Saúde, Brasília, v. 20, n. 3. 2011.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.. **FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento**. 5ª ed. Porto Alegre: Editora UFSC, p.133, 2003.

SIQUEIRA-BATISTA, R.; RAMOS JÚNIOR, NA.; FARINAZZO, RJM.; *et al.* **O *Schistosoma mansoni***. In: Huggins DW, Siqueira-Batista R, Medeiros LB, et al, (editores). *Esquistossomose mansoni*. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr; 1998.

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 (β -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**, v. 55, pp. 695–700, 1965.

SOUZA, C.P.; LIMA, L. C. **Moluscos de interesse parasitológico do Brasil**. 1ª ed., Belo Horizonte: FIOCRUZ/ Centro de Pesquisa René Rachou, 1997.

SOUZA, F.P.C.; VITORINO R.R.; COSTA A.P. *et al.* Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev. Bras.Clin. Med.**, v. 9(4), pp. 300-7, 2011.

STANDEN, D. The effect of temperature light and salinity upon the hatching of the ova of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 45, pp. 225-241, 1952.

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.**, v. 6, pp. 411–425, 2006.

STIREWALT, M. A. **Effect of snail maintenance temperatures on development of *Schistosoma mansoni***. *Exp. Parasitol.*, v. 3, pp. 504-16, 1954.

SUN, J. S.; GEISER, A. H.; FRYDMAN, A. H. A Preparative Synthesis of Lapachol and Related Naphthoquinones. **Tetrahedron Lett.**, v. 39, p. 8221, 1998.

SUZUKI, M.; AMANO, M.; CHOI, J.; PARK, H. J.; WILLIAMS, B. W.; ONO, K.; SONG, C. W. Synergistic effects of radiation and beta-lapachone in DU-145 human prostate cancer cells *in vitro*. **Radiat Res.**, v. 165, p. 525-531, 2006.

SZEJTLI, J. Cyclodextrins in drug formulations: Part I. **Pharm. Tech. Int.**, pp. 15-22, 1991.

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.* V. 80, pp. 323-327, 1995.

TEIXEIRA, B. N.; OZDEMIR, N.; HILL, L. E.; GOMES, C. L Synthesis and Characterization of Nano-Encapsulated Black Pepper Oleoresin using Hydroxypropyl Beta-Cyclodextrin for Antioxidant and Antimicrobial Applications. **Journal of food science**, v. 78, n. 12, pp. N1913-N1920, 2013.

TEIXEIRA, M. G. L. C.; PAIM, J. S. **Os Programas Especiais e o Novo Modelo Assistencial**. *Cad. Saúde Pública.*, v. 6, p. 264-77, 1990.

TEIXEIRA, M. J.; DE ALMEIDA, Y. M.; VIANA, J. R.; HOLANDA FILHA, J. G.; RODRIGUES, T. P.; PRATA, J. R. C.; COELHO, I. C. B.; RAO, V. S.; POMPEU, M. M. L. *In vitro* and *in vivo* Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). **Phytoter. Res.**, v. 15, pp. 44–48, 2001.

THÉTIOT-LAURENT, S. A.; BOSSIER, J.; ROBERT, A.; MEUNIER, B. Schistosomiasis chemotherapy. **Angew Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 52, n. 31, pp. 7936-7956, 2013.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; RAI, A. K.. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences.**, v.2 n. 2, p.72-79, 2010 doi:10.4103/0975-7406.67003. 10 may 2016.

TRANQUILLINI, G.; HOSTALÁCIO, I. D. F. F.; VILLA, R. T.; SILVA, L. G.; LEITÃO, R.; BEDIN, V. Esquistossomose cutânea ectópica: relato de caso. **Med Cutan Iber Lat Am**, v. 39, n. 6, p. 268-271, 2011.

- TSENG, C. H.; CHENG, C. M.; TZENG C. C.; PENG, S. I.; YANG, C. L.; CHEN, Y. L. Synthesis and anti-inflammatory evaluations of β -lapachone derivatives. **Bioorg. Med. Chem.** v. 21, p. 523-531, 2013.
- TZENG, H. P.; HO, F. M.; CHAO, K. F.; KUO, M. L.; LIN-SHIAU, S.; LIU, Y. S. H. 2003. Beta-lapachone reduces endotoxin-induced macrophage activation and lung edema and mortality. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 168, pp. 85–91, 2003.
- TZISIN, Y.; BRONSHIN, A.M. Advances in the development of new anthelmintics. **Pharm. Chem. J. Engl. Trans.**, v. 20, pp. 696-713, 1986.
- UEKAMA, K.; HIRAYAMA, F.; IRIE, T. Cyclodextrin drug carrier systems. **Chemical reviews**, v. 98, n. 5, pp. 2045-2076, 1998.
- UTZINGER, J.; N'GORAN E, K.; CAFFREY, C. R.; KEISER, J. From innovation to application: social-ecological context, diagnostic, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta. Trop.**, v. 120, n. 1, pp. S121-137, 2011.
- VALENTE A. J. M.; SODERMAN, O. L. L. E. The formation of hostguest complexes between surfactants and cyclodextrins. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2013, doi: 10.1016/j.cis. 2013.08.001
- VEIGA, F.; PECORELLI, C. C. M. F.; RIBEIRO, L. As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica. **Minerva Coimbra: Coimbra**, 2006.
- VENNERVALD, B., DUANNE, D., 2004. **Morbidity in schistosomiasis: an update.** Curr. Opin. Infect. Dis. v. 17, pp. 439–447.
- VERONESI, R. Histórico da Esquistossomose. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias**. São Paulo: Guanabara Koogan. 1985.
- VENTURINI, C. D. G., NICOLINI, J., MACHADO, C., MACHADO, V. G.. Properties and recent applications of cyclodextrins. **Química Nova**, v. 31, n. 2, pp. 360-368, 2008.
- VIMIEIRO, A. C.; ARAUJO N.; KATZ, N.; KUSEL, J. R.; COELHO, P. M..“**Schistogram changes after administration of antischistosomal drugs in mice at the early phase of *Schistosoma mansoni* infection**”, Memórias do Instituto Oswaldo Cruz , vol. 108, nº. 7, pp. 881–886, 2013.
- VITORINO R. R.; SOUZA F. P. C.; COSTA, A. P.; FARIA-JUNIOR, F. C.; SANTANA, L. A; GOMES, A. P.. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Rev. Bras. Clin. Med.**, São Paulo v. 10(1), p. 39–45, 2012.
- WANG, F.; BLANCO E.; GAO J.; AI H.; BOOTHMAN, D. A.. Modulating β -lapachone release from polymer millirods through cyclodextrin complexation, **Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 95, n. 10, p. 2309–2319, 2006.
- WANG, W.; WANG, L.; LIANG, Y. S.. Susceptibility or resistance of praziquantel. In human schistosomiasis: a review. **Parasitol. Res.**, v. 111, p. 1871–1877, 2012.

WHITACRE, C. M.; ZBOROWSKA, E.; GORDON, N. H.; MACKAY, W.; BERGER, N.A.; **CANCER RES.**, v. 57, p. 1425, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Elimination of schistosomiasis in low transmission areas**: Salvador, Bahia, 18-19 Aug. 2008. Geneva, 2009. Report of the WHO informal consultation.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The control of schistosomiasis**: Second Report of WHO Expert Committee. Geneva, Switzerland, pp. 8-15, Nov. 1991. Geneva, 1993. World Health Organization, Technical Report Series.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Schistosomiasis**, Fact Sheet No. 115. Geneva, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 11 out. 2014.

WYLER, D. J.; WAHL, S. M.; WAHL, L. M. Hepatic fibrosis in schistosomiasis: egg granulomas secrete fibroblast stimulating factor in vitro. **Science**, v. 202, p. 438-440, 1978.

WYNN, T. A.; CHEEVER, A. W. Cytokine regulation of granuloma formation in schistosomiasis. **Current Opinion in Immunology**, Philadelphia, v. 7, p. 505-511, 1995.

WYNN T. A., THOMPSON R. W., CHEEVER A. W., MENTINK-KANE, M. M. Immunopathogenesis of schistosomiasis. **Immunol. Rev.**, 201:156–167, 2004.

XIAO, S. H.; CATTO, B.A.; WEBSTER, L. T.. Effects of praziquantel on different development *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. **J. of Infectious Diseases.**, v. 151, p. 1130-1137, 1985.

XIE, H.; YANG, B.; WANG, F.; ZHAO, Y. Host-guest inclusion system of artesunate with β - cyclodextrin and its derivatives: Characterization and antitumor activity. **Journal of Molecular Structure**, v. 1085, p. 90-96, 2015.

YANG, H. et al. A thermodynamic study of the cyclodextrin – UC781 inclusion complex using a HPLC method. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, Dordrecht, v. 72, n. 3-4, p. 459-465, Apr. 2012.

ZUIM, N. R. B.; ALLEGRETTI, S. M.; LINHARES, A. X.; MAGALHÃES, L. A. ; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M. A study of the granulomatous responses induced by different strains of *Schistosoma mansoni*. Acessado em 10 de julho de 2016. Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/953524>.