



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

VICTOR HUGO BARBOSA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA ASSOCIAÇÃO β -
LAPACHONA/PRAZIQUANTEL**

RECIFE-PE

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

VICTOR HUGO BARBOSA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA ASSOCIAÇÃO β -
LAPACHONA/PRAZIQUANTEL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

Co-orientador: Prof^o. Dr. André de Lima Aires

RECIFE-PE

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Kyria de Albuquerque Macedo, CRB4: 1693

S237a Santos, Victor Hugo Barbosa dos.
Avaliação da atividade esquistossomicida da associação β -
lapachona/praziquantel / Victor Hugo Barbosa dos Santos . – 2018.
88 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Mônica Camelo Pessôa de Azevedo Albuquerque.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro
de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas.

Inclui referências e anexo.

1. Schistosoma mansoni. 2. Esquistossomose mansoni. 3. Praziquantel.
4. Combinação de Medicamentos. 5. Técnicas In Vitro. I. Albuquerque,
Mônica Camelo Pessôa de Azevedo (orientadora). II. Título.

615 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS 2018 - 106)

VICTOR HUGO BARBOSA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA ASSOCIAÇÃO β -
LAPACHONA/PRAZIQUANTEL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários ao grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 28/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque (Presidente)
Universidade Federal de Pernambuco

Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes (Titular Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Jeymesson Raphael Cardoso Vieira (Titular Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Sou grato a Deus por ter me concedido fé e perseverança para enfrentar todos os obstáculos durante a realização deste trabalho, e pela imensa alegria de ter alcançado os objetivos.

Agradeço a minha mãe pela força e por todo o suporte dado.

Aos meus orientadores, profa.Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque e André de Lima Aires, pela oportunidade e confiança para realização do projeto, e por sempre estarem preocupados em cada etapa deste trabalho.

A Profa. Dra. Eulália Camelo P. de A. Ximenes do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica dos Microrganismos do Departamento de Antibióticos-CB da UFPE e ao Prof. Dr. Pedro José Rolim Neto Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE que cederam os compostos avaliados.

Aos meus amigos Leydianne Queiroz, Wivianne Souza, José Leandro, Luanna Sorares Caio Guedes, Gustavo Ramos, Mário Albuquerque, Larissa Costa, Raquel Vasconcelos, Renan Fernandes, Nathaly Monte, Thuanny Maryna e Orlando Fidelis.

À FACEPE, pela concessão da bolsa tornando possível a realização deste trabalho.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença endêmica parasitária presente nos continentes da América do Sul, da África e Ásia atingindo mais de 250 milhões de pessoas, sendo considerada como a segunda doença negligenciada de importância em saúde pública. O único fármaco disponível para o tratamento é o praziquantel (PZQ) o qual se mostra seguro e eficaz contra as todas as espécies de *Schistosoma* spp. Entretanto, não impede a reinfeção e não é eficaz contra as fases jovens do verme. Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade esquistossomicida, *in vitro*, da β -lapachona isolada e no complexo de inclusão β -ciclodextrina (β CD- β -lapachona) e o efeito esquistossomicida da associação com praziquantel (PZQ) sobre as diferentes fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (Cepa BH). Caramujos *Biomphalaria glabrata* foram infectados com miracídeos de *S. mansoni* (cepa BH) e após 30 dias foram expostos a luminosidade artificial para obtenção das cercárias, as quais foram utilizadas para obtenção mecânica dos esquistossômulos com 3 horas. Camundongos fêmeas *Swiss webster*, previamente anestesiados, foram infectados por via per cutânea com uma suspensão média de 120 cercárias. Após 21 e 50 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados e os vermes jovens e adultos foram obtidos através da perfusão hepática. A partir da susceptibilidade *in vitro* frente a β -lapachona, β -CD- β -lapachona e praziquantel (PZQ) no intervalo de 24 horas a CL₅₀ foi determinada, respectivamente, em 0,23 μ M, 0,15 μ M e 164,9 μ M para esquistossômulos com 3 horas; 15,6 μ M, 17,2 μ M, 78,9 μ M, para vermes jovens com 21 dias; 69 μ M, 60 μ M e 1,8 μ M para verme adulto macho e 6,6 μ M, 6,2 μ M e 36,4 μ M para verme adulto fêmea. A associação da β -lapachona/PZQ apresentou efeito sinérgico na concentração associada da CL₅₀ e subinibitórias frente a vermes jovens e adultos macho e fêmea. Já a associação da β CD- β lapachona/PZQ foi sinérgica frente aos vermes jovens e adultos machos, também expostos às concentrações da CL₅₀ e subinibitórias.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Praziquantel. Tratamento combinado. *In vitro*

ABSTRACT

Schistosomiasis is an endemic parasitic disease present in the continents of South America, Africa and Asia, with more than 250 million infected people, being considered as the second neglected disease of importance in public health. The only drug available for treatment is praziquantel (PZQ) which is safe and effective against all species of *Schistosoma* spp. However, it does not prevent reinfection and is not effective against immatures worms. The aim of this study was to evaluate the *in vitro* schistosomicidal activity of β -lapachone alone and in the β -cyclodextrin inclusion complex (β CD- β -lapachona) and the schistosomicidal effect of the association with praziquantel (PZQ) on different stages of *Schistosoma mansoni* (BH strain). *Biomphalaria glabrata* snails were infected with *S. mansoni* miracidia (BH strain) and after 30 days the artificial light was obtained to obtain the cercariae, which were used to obtain the schistosomula with 3 hours. Previously anesthetized female Swiss mice were infected by percutaneously route with 120 cercariae. After 21 and 50 days of infection, the mice were euthanized and the immature and adult worms were obtained through hepatic perfusion. From the *in vitro* susceptibility to β -lapachone, β -CD- β -lapachone and praziquantel (PZQ) within 24 hours the LC₅₀ was determined, respectively, at 0.23 μ M, 0.15 μ M and 164.9 μ M for schistosomula with 3 hours; 15.6 μ M, 17.2 μ M, 78.9 μ M, for immature worms with 21 days; 69 μ M, 60 μ M and 1.8 μ M for adult male worm and 6.6 μ M, 6.2 μ M and 36.4 μ M for adult female worm. The association of β -lapachone/PZQ showed a synergistic effect on the associated concentration of LC₅₀ and subinhibitory against immature and adult male and female worms. The association of β CD- β -lapachone/PZQ was synergistic with immature and adult male worms, also exposed to LC₅₀ and subinhibitory concentrations.

Key words: *Schistosoma mansoni*. Praziquantel. Combined modality therapy. *In vitro*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição mundial da Esquistossomose	15
Quadro 1- Características das espécies de <i>Schistosoma</i> e sua distribuição geográfica.....	16
Figura 2- Prevalência da Esquistossomose em escolares na América do Sul e Caribe.....	17
Figura 3- Distribuição da Esquistossomose no Brasil de acordo com faixa de positividade	18
Figura 4- Distribuição geográfica das espécies <i>Biomphalaria</i>	20
Figura 5- Mapa com a distribuição de municípios prioritários para esquistossomose em Pernambuco.....	20
Figura 6- Ovo maduro de <i>S. mansoni</i>	23
Figura 7- Miracídio <i>S. mansoni</i>	24
Figura 8- Esporocisto em corte histológico do tecido de caramujo <i>B. glabrata</i>	25
Figura 9- Cercária de <i>S. mansoni</i>	26
Figura 10- Esquistossômulos de <i>S. mansoni</i>	27
Figura 11- Verme jovem (21 dias) macho de <i>S. mansoni</i>	28
Figura 12- Verme adulto macho de <i>S. mansoni</i>	29
Figura 13- Fêmea adulta de <i>S. mansoni</i>	30
Figura 14- Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	31
Figura 15- Estrutura molecular do Praziquantel	36
Figura 16- Estrutura molecular β -lapachona	38
Figura 17- Ciclização do lapachol e formação da β -lapachona	38
Figura 18- Ciclo Redox das quinonas	39
Figura 19- Classificação das ciclodextrina	42
Figura 20- Estrutura funcional da ciclodextrina e formação do complexo de inclusão.....	43
Figura 21- Gráfico da relação do Índice de Combinação e Fração afetada (Fa-IC) para vermes jovens β -Lapachona-PZQ.....	65
Figura 22- Gráfico da relação do Índice de Combinação e Fração afetada (Fa-IC) para verme adulto macho β -Lapachona-PZQ.....	66

Figura 23- Gráfico da relação do Índice de Combinação e Fração afetada (Fa-IC) para verme adulto fêmea β -Lapachona-PZQ.....	67
Figura 24- Gráfico da relação do Índice de Combinação e Fração afetada (Fa-IC) para vermes jovens β CD- β -Lapachona-PZQ.....	68
Figura 25- Gráfico da relação do Índice de Combinação e Fração afetada (Fa-IC) para verme adulto macho β CD- β -Lapachona-PZQ.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Presença dos hospedeiros intermediários de <i>Schistosoma mansoni</i> por estados e números de municípios na região nordeste do Brasil.....	19
Tabela 2- Número e taxa de infecção de moluscos hospedeiros intermediários no litoral de Pernambuco.....	21
Tabela 3- Score de motilidade, expresso em percentagem, de esquistossômulos com 3 horas controles e tratados com β -lapachona livre em 24h de incubação.....	52
Tabela 4- Score de motilidade, expresso em percentagem, de esquistossômulos com 3 horas controles e tratados com β CD- β -lap em 24h de incubação.....	53
Tabela 5- Score de motilidade, expresso em percentagem, de esquistossômulos com 3 horas controles e tratados com PZQ em 24h de incubação.....	54
Tabela 6- Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes jovens de <i>S. mansoni</i> controles e tratados com β -lapachona livre em 24h de incubação.....	55
Tabela 7- Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes jovens de <i>S. mansoni</i> controles e tratados com β CD- β -lapachona em 24h de incubação.....	56
Tabela 8- Score de motilidade de vermes jovens de <i>S. mansoni</i> controles e tratados com PZQ em 24h de incubação.....	57
Tabela 9- Score de motilidade, expresso em percentagem de vermes adultos machos de <i>S. mansoni</i> controles e tratados com β -lapachona livre em 24h de incubação.....	58
Tabela 10- Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes adultos machos de <i>S. mansoni</i> controles e tratados com β CD- β -lapachona em 24h de incubação.....	59
Tabela 11- Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes adultos machos de <i>S. mansoni</i> controles e tratados com PZQ em 24h de incubação.....	60
Tabela 12- Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes adultos fêmeas de <i>S. mansoni</i> controles e tratados com β -lapachona livre em 24h de incubação.....	61
Tabela 13- Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes adultos fêmeas de <i>S. mansoni</i> controles e tratados com β CD- β -lapachona em 24h de incubação.....	61

Tabela 14- Score de motilidade, expresso em porcentagem, de vermes adultos fêmeas de <i>S. mansoni</i> controles e tratados com Praziquantel em 24h de incubação.....	62
Tabela 15- Efeito esquistossomicida de β -lapachona, β CD- β -lapachona e Praziquantel contra formas evolutivas de <i>Schistosoma mansoni</i> após 24h.....	63
Tabela 16- Efeito da β -lapachona e Praziquantel sobre vermes adultos machos de <i>S. mansoni</i> (50 dias) após 24 horas.....	64
Tabela 17- Efeito da β -lapachona e Praziquantel sobre vermes adultos fêmeas de <i>S. mansoni</i> (50 dias) após 24 horas.....	65
Tabela 18- Efeito da β -lapachona e Praziquantel sobre vermes jovens de <i>S. mansoni</i> (21 dias) após 24 horas.....	66
Tabela 19- Efeito da associação β CD- β -Lapachona e Praziquantel sobre vermes adultos machos de <i>S. mansoni</i> (50 dias) após 24 horas.....	67
Tabela 20- Efeito da associação β CD- β -Lapachona e Praziquantel sobre vermes jovens de <i>S. mansoni</i> (21 dias) após 24 horas.....	69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Aspectos epidemiológicos e geográficos da Esquistossomose.....	15
2.2 <i>Schistosoma mansoni</i>	22
2.2.1 Aspectos biológicos e morfológicos nas diferentes fases evolutivas	22
2.2.2 Ciclo biológico	30
2.2.3 Patogenia	34
2.2.4 Tratamento	35
2.3 β -Lapachona	37
2.4 Ciclodextrina.....	41
2.5 Associação de fármacos: aplicações e finalidades.	44
3 OBJETIVOS	46
3.1 Objetivo geral	46
3.2 Objetivos específicos	46
4 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.1 Considerações éticas	47
4.2 Compostos	47
4.3 Infecção de Caramujos, Obtenção de Cercárias e Infecção de Camundongos com <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa BH).	48
4.4 Avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> dos esquistossômulos com 3 horas frente a β -lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel.	48
4.5 Avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> dos vermes jovens com 21 dias frente a β - lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel.	49
4.6 Avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> dos vermes adultos com 50 dias frente a β - lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel.	49

4.7 Determinação da atividade esquistossomicida da associação β -lapachona/PZQ e β CD- β lapachona/PZQ frente às diferentes fases evolutivas de <i>Schistosoma mansoni</i> (Cepa BH).	50
4.8 Critério de avaliação.....	51
5 RESULTADOS	52
5.1 Avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> de esquistossômulos com 3 horas frente a β -lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel.	52
5.2 Avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> dos vermes jovens com 21 dias frente a β -lapachona livre, β CD- β -lapachona e praziquantel.....	54
5.3 Avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> dos vermes adultos machos com 50 dias frente a β -lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel.....	57
5.4 Avaliação da susceptibilidade <i>in vitro</i> dos vermes adultos fêmeas com 50 dias frente a β -lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel.....	60
5.5 Ensaio de compostos isolados contra as formas evolutivas de <i>S. mansoni</i> (cepa BH).	63
5.6 Efeito da combinação β -Lapachona-PZQ contra esquistossômulos, vermes jovens e vermes adultos machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> (cepa BH).....	63
5.7 Efeito da combinação β CD- β -Lapachona-PZQ contra esquistossômulos, vermes jovens e vermes adultos machos e fêmeas de <i>S. mansoni</i> (cepa BH).....	67
6 DISCUSSÃO	70
7 PERSPECTIVAS	76
8 CONCLUSÃO	77
REFERÊNCIAS	78
ANEXO A- Aprovação do CEUA/UFPE	88

1 INTRODUÇÃO

O precário investimento em sistemas sanitários é um dos principais obstáculos relacionado à saúde pública. Esta problemática chama atenção para as doenças negligenciadas que prevalecem em regiões carentes, as quais não possuem uma atenção primária em saneamento básico. Os investimentos em pesquisa e medicamentos para o controle endêmico são bastante reduzidos, principalmente pelo fato de atingir comunidades de baixa renda, em que as instituições farmacêuticas que visam ao lucro não se mobilizam de forma integral (BRASIL, 2014; HOTEZ, 2013)

Dentro desse contexto destaca-se a esquistossomose, uma doença endêmica parasitária causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, a qual enquadra-se como a segunda principal doença negligenciada. Os últimos dados epidemiológicos mostram que o número de portadores da esquistossomose atinge mais de 250 milhões de pessoas no mundo. As espécies de *Schistosoma* estão distribuídas nos continentes Asiático (*Schistosoma japonicum*) Africano (*Schistosoma haematobium*, *Schistosoma mansoni*) e América do Sul (*Schistosoma mansoni*) (KATZ, 2008; WHO, 2017).

Na América do Sul, o Brasil é o país com o maior número de casos em esquistossomose mansônica sendo endêmico em 19 estados federativos. Os estados da região nordeste (Alagoas, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba e Sergipe) e o estado de Minas Gerais no sudeste, são as áreas com o maior número de notificações. Segundo dados do Ministério da Saúde, em 2015 os maiores índices de internações e óbitos foram registrados em Pernambuco. Já em 2016 o estado de Alagoas foi o estado com o maior número de casos seguido por Pernambuco (BRASIL, 2014).

O quadro clínico da esquistossomose divide-se em duas fases: aguda e crônica. Esta última, é a fase que está estritamente relacionada com os índices de mortalidade, pois caracteriza-se pela forma grave da doença, a hepatoesplênica. Nesta fase, as reações inflamatórias que tornam-se intensas à medida que os ovos vão sendo depositados no tecido e vasos hepáticos resultam em um estado fibrótico comprometendo a fisiologia do órgão. As apresentações clínicas evidenciam um aumento do fígado e baço, ascite e vasos esofagianos que evoluem para o óbito do paciente (GRYSEELS et al. 2006).

O praziquantel (PZQ), (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino{2,1-a}isoquinolina-4-ona), um derivado pirazinoisoquinolina é o fármaco de escolha para tratamento, o qual é seguro e eficaz frente a todas as espécies de *Schistosoma*. Embora o PZQ seja caracterizado como um fármaco ideal, a sua ação possui algumas limitações. Dentre elas destacam-se: eficácia apenas contra a fase adulta do verme; não impede ou minimiza os danos resultantes das reações inflamatórias causadas pelo ovo; não impede a reinfecção; e por ser o único fármaco, o seu uso repetido em áreas altamente endêmicas aumenta a probabilidade para o surgimento de cepas resistente. Diante dessa problemática, estudos vem sendo realizados em busca de novas alternativas quimioterápicas que possam contornar os fatores limitantes que ainda são encontradas pelo PZQ (SILVA et al. 2017).

A β -lapachona é uma orto-naftoquinona semissintética e lipofílica derivada do lapachol, o qual pode ser obtido das cascas de árvores da Família Bignoniaceae. A β -lapachona em sua forma isolada tem chamado atenção devido a sua potente atividade antitumoral, por indução da formação de radicais livres e/ou indução da via apoptótica (KEE et al. 2016; YU et al. 2014). Apesar de ser amplamente estudada em modelos neoplásicos, outros alvos biológicos já se mostraram susceptíveis a ação da β -lapachona. Dentre eles estão: ação antifúngica (BRILHANTE et al. 2016), antibacteriano (MACEDO et al. 2013), anti *T. cruzi* (SALAS et al. 2008) antihelmínticos frente a larvas de *Toxocara canis* (SANTOS et al. 2015) e *Schistosoma mansoni* (AIRES et al. 2014)

A quimioterapia combinada é amplamente utilizada para o tratamento de infecções por vírus como os da hepatite C e HIV, bacterianas e na malária, bem como para doenças não infecciosas nos casos de asma e câncer. Os principais benefícios atribuídos a combinação de medicamentos estão relacionados a redução de resistência, uma maior eficácia e redução de efeitos adversos (TALLARIDA et al. 2001). A associação de novos fármacos com o PZQ para o tratamento da esquistossomose poderá potencializar o efeito esquistossomicida. Além disso, a redução das doses, principalmente do PZQ, minimiza os riscos no surgimento de cepas resistentes frente aos fármacos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos e geográficos da Esquistossomose

Prevalente em países tropicais e subtropicais, a esquistossomose é notificada em 78 países onde há mais de 250 milhões de pessoas infectadas, onde estima-se mais de 200 mil mortes por ano. Em 2015, mais de 66 milhões de pessoas foram tratadas, atingindo principalmente a população de comunidades que apresentam déficit de água potável e saneamento básico de qualidade (GRIMES et al. 2014; WHO, 2017).

A esquistossomose é considerada uma doença endêmica parasitária ligada às condições socioculturais e ao baixo desenvolvimento econômico, onde mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas de risco. O *Schistosoma* é distribuído principalmente pelos continentes Africano, Asiático e América Latina (Figura 1). Devido aos agravos provocados pelos quadros agudos e crônicos da doença e aos índices de morbimortalidades, a esquistossomose tem sido classificada como a segunda infecção parasitária de importância em saúde pública, ficando atrás apenas da malária (ROCHA et al. 2016).

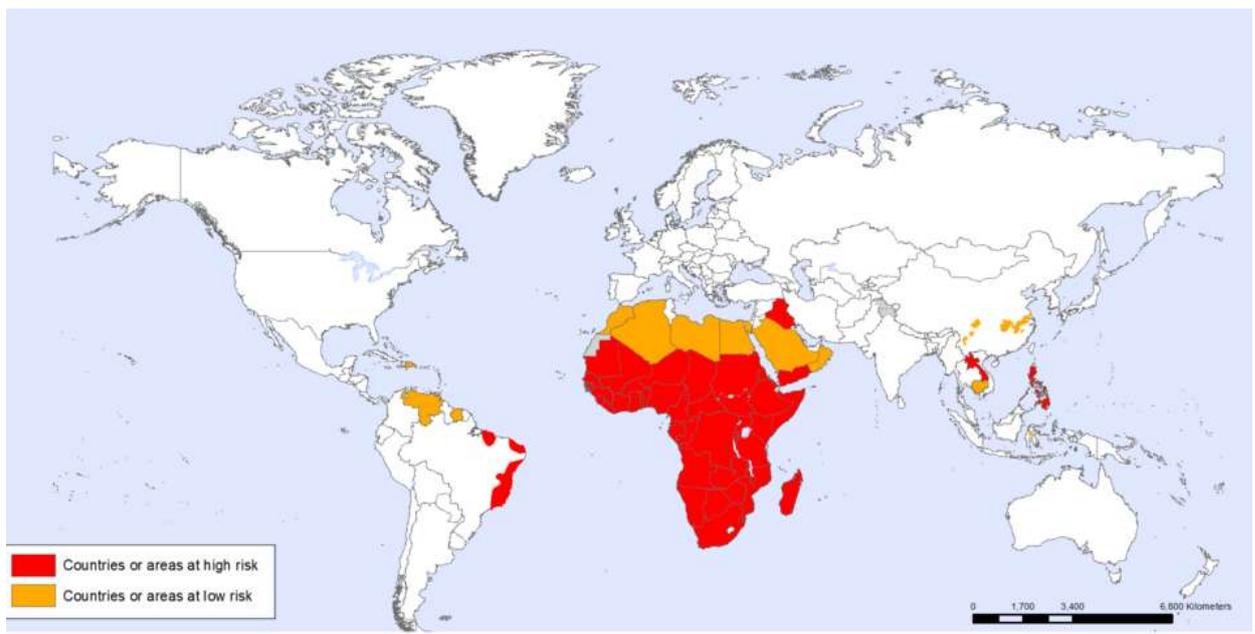


Figura 1- Distribuição mundial da Esquistossomose (WHO, 2015).

O gênero *Schistosoma* é classificado em 5 espécies: *Schistosoma hematobium*, *Schistosoma intercalatum*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi* e *Schistosoma mansoni*. A distribuição e o predomínio de cada espécie devem-se a fatores como hospedeiro intermediário e o clima. As demais considerações relevantes para a classificação das espécies e a sua distribuição mundial podem ser analisadas no quadro 1 (COLLEY et al. 2014).

Espécie	Morfologia do ovo	Habitat do verme adulto	Hospedeiro intermediário	Distribuição geográfica
<i>Schistosoma mansoni</i>	Ovo com espículo lateral	Intestinal	<i>Biomphalaria</i>	África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname
<i>Schistosoma japonicum</i>	Ovoide com espículo lateral	Intestinal	<i>Oncomelania</i> sp	China, Indonésia, Filipinas
<i>Schistosoma mekongi</i>	Ovoide com rudimento de espículo lateral	Intestinal	<i>Neotricula aperta</i>	Diversos distritos do Camboja e da República Democrática popular do Laos
<i>Schistosoma intercalatum</i>	Ovo elipsoide com esporão terminal	Intestinal	<i>Bulinus</i> sp	Florestas Tropicais da África Central
<i>Schistosoma hematobium</i>	Ovo elipsoide com espículo terminal	Urogenital	<i>Bulinus</i> sp	África, Oriente Médio, Córsega (França).

Quadro 1- Características das espécies de *Schistosoma* e sua distribuição geográfica. Fonte: Do autor

Mais de 90% dos casos registrados da esquistossomose encontra-se na África, onde há o predomínio de *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma hematobium* como as principais espécies responsáveis pela ocorrência da doença. Muitos países do Norte da África (Egito, Líbia, Marrocos e Tunísia) têm implantado programas no controle da esquistossomose, obtendo resultados satisfatórios. No entanto, muitos países da África Subsaariana ainda estão muito distantes de alcançarem a diminuição e a erradicação do parasita. (LAI et al. 2015; WHO, 2016).

Na América Central e América do Sul a única espécie responsável pelo quadro endêmico da esquistossomose é o *Schistosoma mansoni*, sendo localizado na Venezuela, Suriname, República Dominicana, Guadalupe, Santa Lucia, Caribe e várias regiões do Brasil. Estima-se que 1,8 milhões de pessoas estejam infectadas,

onde os maiores registros são dos estados situados na costa litorânea do Brasil, e que 25 milhões vivem em áreas de risco (WHO, 2013). Por meio dos levantamentos de dados para apurar a prevalência da esquistossomose em escolares de até 14 anos realizado pela OMS entre os períodos de 1942 a 2014, revelou que entre os países latinos o Brasil apresentou o maior índice com 58,4% (figura 2), destacando os estados de Minas Gerais, Bahia e Pernambuco com os maiores registros da doença (ZONI e CATALÁ, 2015; ZONI et al. 2016).

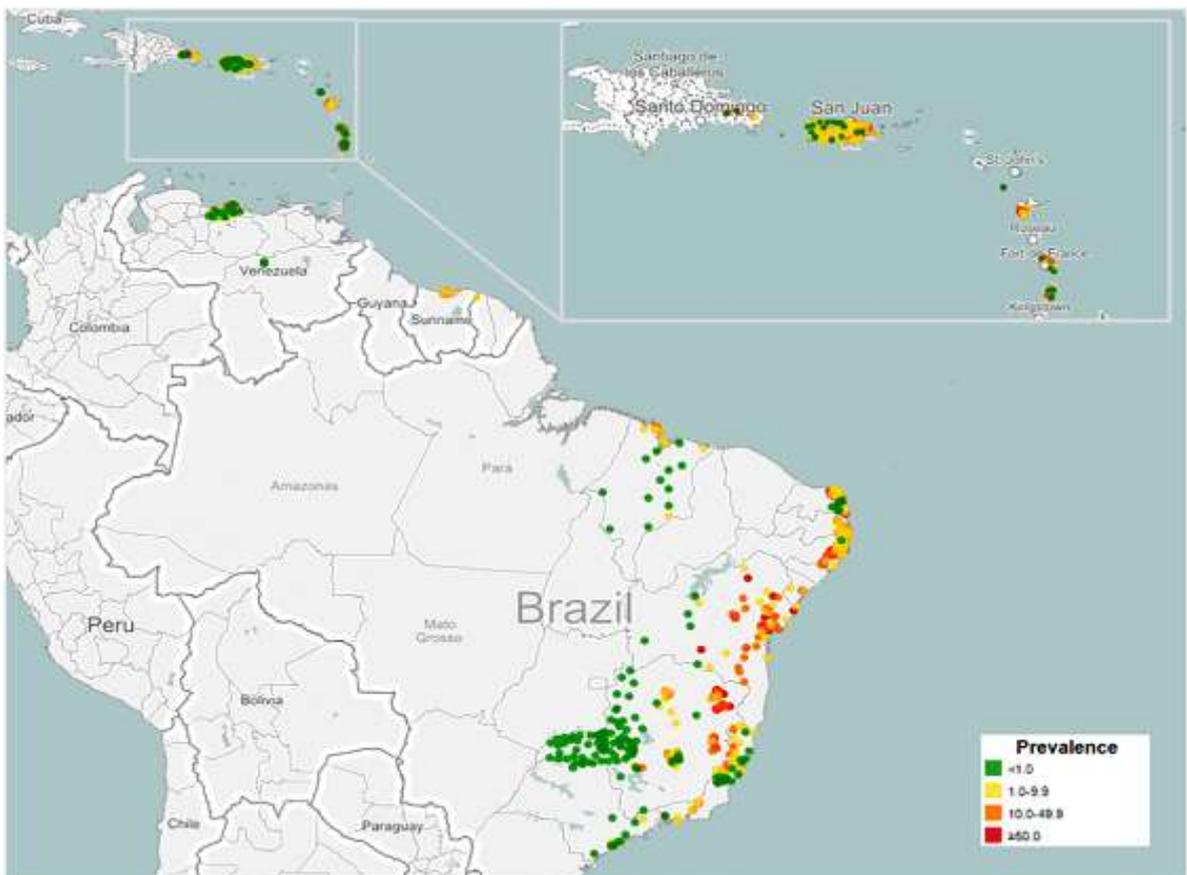


Figura 2- Prevalência da Esquistossomose em escolares na América do Sul e Caribe (1942-2014).
Fonte: ZONI et al., 2016.

Nas últimas décadas, dados epidemiológicos têm mostrado redução de novos registros da doença no continente Latino. Alguns pontos relevantes que conduziram a essa conclusão incluem a elevação socioeconômica e ao aumento de ações em saúde pública. A migração da população rural para o meio urbano tem sido citada como um ponto contribuinte na diminuição da transmissão da esquistossomose devido ao distanciamento das fontes hídricas e limitando assim o contato com rios que abrigam os moluscos infectados pelo *Schistosoma mansoni*. Entretanto, sabe-se que muitos polos urbanos ainda não fornecem o tratamento adequado da água e

saneamento básico de qualidade, tornando dessa forma um desafio para a eliminação da esquistossomose (ZONI e CATALÁ, 2015).

No Brasil, *Schistosoma mansoni* está presente em 19 estados com os maiores focos em toda área litorânea da região nordeste, em destaque Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia, no sudeste o estado de Minas Gerais e em áreas isoladas da região sul do país (Figura 3) (KATZ, 2008; SCHOLTE et al. 2013).

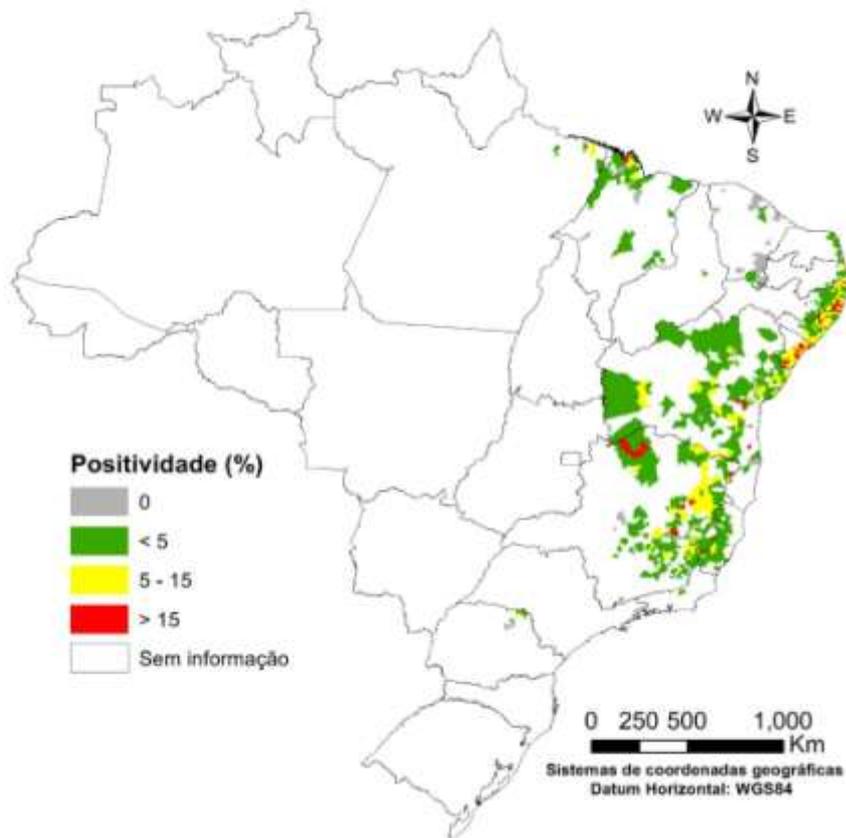


Figura 3- Distribuição da Esquistossomose no Brasil de acordo com faixa de positividade (2010-2015).

Fonte: Ministério da Saúde.

A presença do hospedeiro intermediário foi um fator chave para a permanência do *Schistosoma mansoni* no Brasil. O molusco responsável pela transmissão pertence à família Planorbidae, gênero *Biomphalaria* tendo como habitat as coleções de água doce. O molusco transmissor é classificado em 10 espécies e uma subespécie, porém apenas três são conhecidos como agentes

naturalmente infectados e potencialmente transmissores: O *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea* (BRASIL, 2014).

A região nordeste possui o maior número de estados com ampla distribuição das espécies de *Biomphalaria* com potencial risco de transmissão do *S. mansoni* (tabela 1). Apesar da sua maior concentração na região nordeste, as demais regiões do Brasil não fogem das altas estatísticas em notificações do caramujo (figura 4). A espécie *Biomphalaria glabrata* é a mais recorrente na região norte e nordeste do país, embora seja notificado nos estados do Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (CARVALHO et al. 2008).

O estado de Pernambuco é umas das unidades federadas enquadrado como a mais endêmica para esquistossomose, onde em 2013 foram notificados 141 óbitos representando um terço do total da mortalidade registrada no país. As cidades consideradas como prioritárias (com índice de positividade $\geq 10\%$ no período 2010-2014) estão situadas no litoral, zona da mata e algumas áreas do agreste destacando-se: I GERES-Araçoiaba, Moreno, São Lourenço da Mata e Vitória de Santo Antão; II GERES-Carpina, Machados, Tracunhaém e Vicência; III GERES-Água Preta, Escada, Gameleira, Jaqueira, Lagoa dos Gatos, Palmares, Primavera, Quipapá, Ribeirão, Rio Formoso, São Benedito do Sul, Sirinhaém e Xexéu; V GERES-Brejão; XII GERES-Aliança, Goiana, Itaquitinga e Timbaúba (Figura 5) (SEVS/SES-PE, 2015).

Tabela 1- Presença dos hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* por estados e números de municípios na região nordeste do Brasil. Fonte: Carvalho, et al 2008. Adaptado.

NÚMERO DE MUNICÍPIOS			
ESTADOS	<i>B. glabrata</i>	<i>B. tenagophila</i>	<i>B. straminea</i>
Alagoas	40	-	52
Bahia	301	8	411
Ceará	-	-	117
Maranhão	30	-	39
Paraíba	15	-	76
Pernambuco	21	-	131
Piauí	1	-	76
Rio Grande do Norte	20	-	77
Sergipe	49	-	30

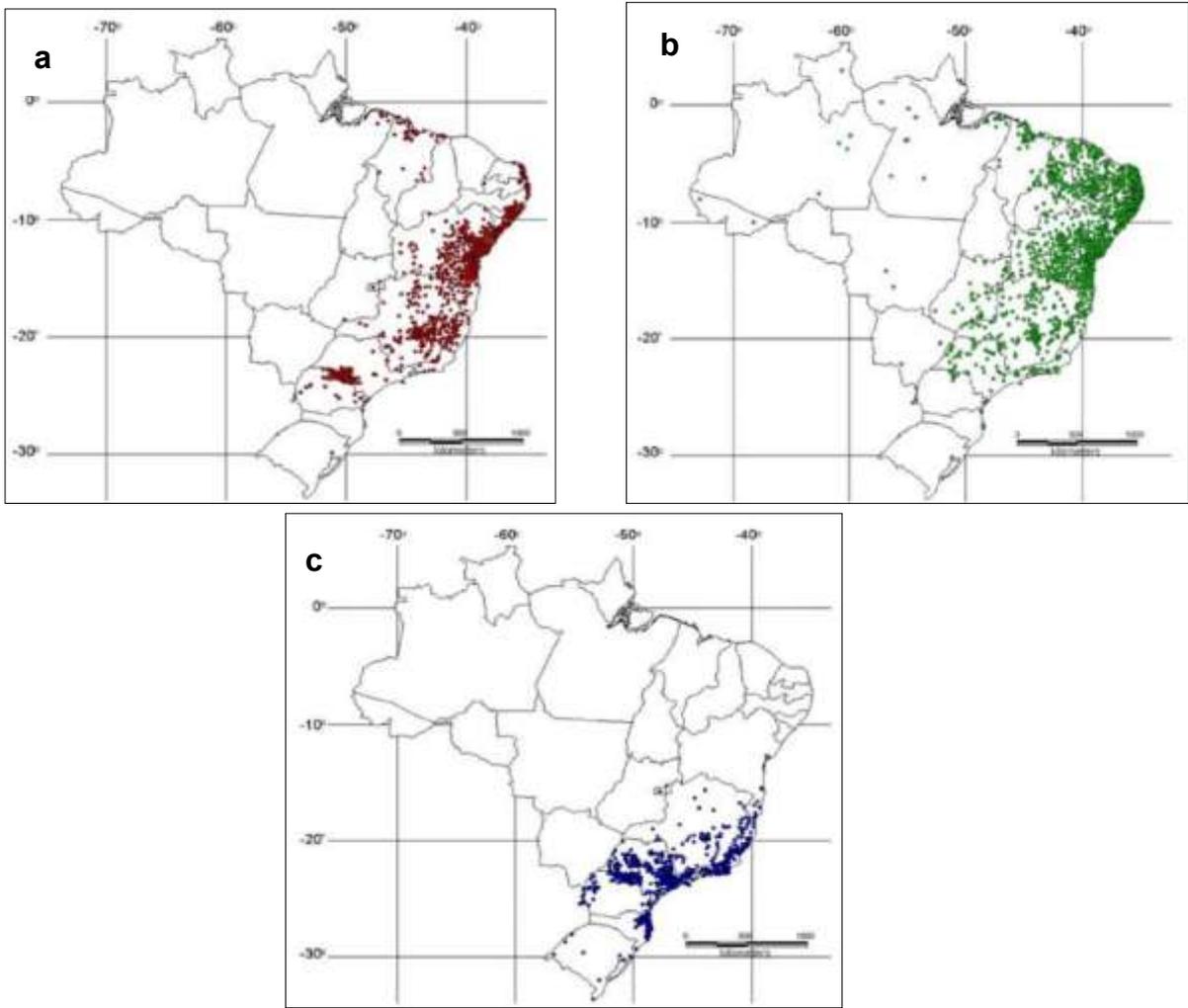


Figura 4- Distribuição geográfica das espécies: a) *B. glabrata*, b) *B. straminea* e c) *B. tenagophila*.
 FONTE: Carvalho e Caldeira 2004.

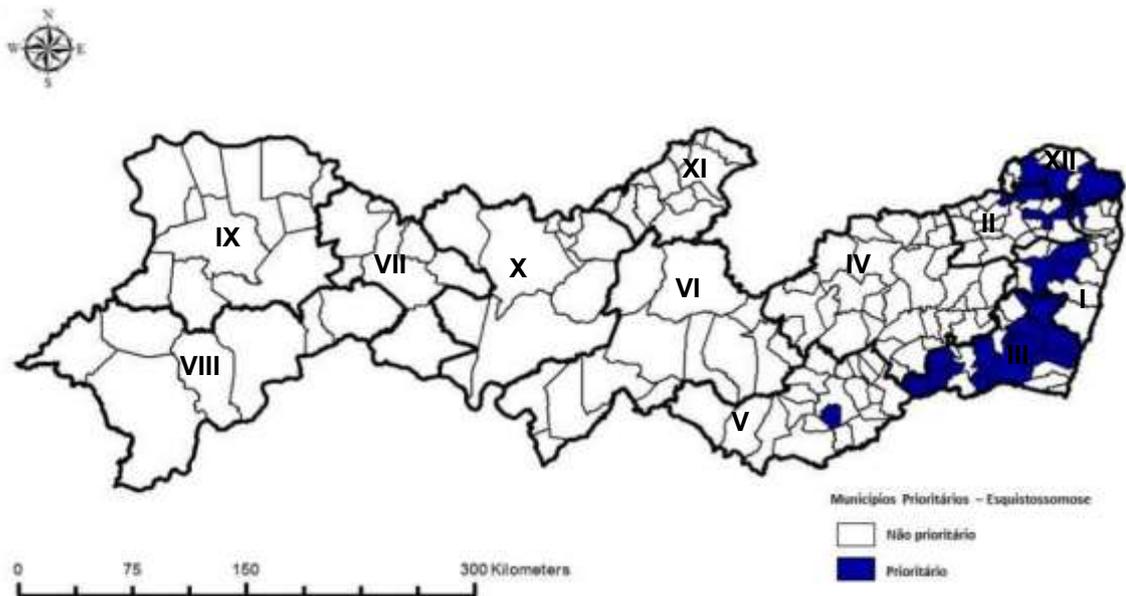


Figura 5- Mapa com a distribuição de municípios prioritários para esquistossomose em Pernambuco, adaptado. Fonte: SANAR/SEVS/SES-PE.

Caracterizada como uma doença do meio rural, a esquistossomose passou a ser registrada no litoral de Pernambuco a partir da década de 90. A migração populacional portadora da doença foi impulsionada pela busca de empregos e melhores condições de vida. As transferências desordenadas e não planejada fizeram com que muitos desses indivíduos passassem a habitar nas periferias da cidade. Vivendo em situações precárias no que se diz respeito ao saneamento básico adequado, contribuindo para a contaminação de coleções hídricas. O lançamento dos dejetos humanos em rios e lagos proporcionam a contaminação de criadouros naturais dos moluscos hospedeiros intermediários, resultando na continuidade do ciclo de transmissão do *Schistosoma mansoni*. Em Recife foram detectados 30 criadouros de *Biomphalaria straminea*, dos quais quatro são focos potenciais de transmissão (BARBOSA et al. 2013).

A região de Porto de Galinhas em 2011 registrou 36 criadouros de *Biomphalaria glabrata*, em que onze locais foram considerados de risco. Outras localidades do litoral também foram notificadas por apresentarem criadouros do molusco (Tabela 2). Em 2013, foram coletados 485 caramujos *B. glabrata* em Porto de Galinhas, os quais apresentaram taxa de infecção correspondente 81,9%, demonstrando um local de alta transmissão (GOMES et al. 2014).

Tabela 2- Número e taxa de infecção de moluscos hospedeiros intermediários no litoral de Pernambuco. Fonte: Barbosa et al., 2014. Adaptado.

CIDADES	PERÍODO (2008)		TAXA DE INFECÇÃO	
	<i>B. glabrata</i>	<i>B. straminea</i>	<i>B. glabrata</i>	<i>B. straminea</i>
Cabo de Santo Agostinho	-	33	-	-
Goiana	227	109	4%	-
Igarassu	-	89	-	-
Itamaracá	709	138	12,2%	-
Jaboatão dos Guararapes	1539	-	6,5%	-
Porto de Galinhas/Ipojuca	469	-	22,2%	-
Paulista	481	338	17,1% (Pau Amarelo) 4,4% (Janga)	0,9%
Recife	-	18	-	-
Tamandaré	194	-	16,5%	-

Composto por 43 municípios, a Zona da Mata é considerada uma das principais regiões endêmicas no Brasil. Uma área que tem como destaque em sua economia a cana-de-açúcar, revela a forte influência da população rural e suas condições de habitacionais na prevalência da esquistossomose. Em 2004, a Zona da Mata apresentou um índice de 13,7% de amostras positivas para *Schistosoma mansoni*, e em 2005 a taxa de positividade em escolares entre 9-12 anos foi de 14,4%. (FAVRE et al. 2006; BARBOSA et al. 2010).

Diante do quadro emergencial, o governo de Pernambuco através do Decreto nº39.497, de 11 de junho de 2013, tem implementado o Programa de Enfretamento às Doenças Negligenciadas-SANAR, incluindo neste plano a esquistossomose. Juntamente a Secretaria de Saúde e a Secretaria Executiva de Vigilância em Saúde do Estado visam, em médio e longo prazo, a redução e a erradicação de novos casos da esquistossomose nos municípios considerados prioritários para o Governo (MS, 2016; SVS/SES-PE, 2015).

2.2 Schistosoma mansoni

2.2.1 Aspectos biológicos e morfológicos nas diferentes fases evolutivas

O *Schistosoma mansoni* apresenta diferentes fases evolutivas que variam de acordo com o hospedeiro e o local que o alberga em: ovo, miracídio, esporocisto, cercária, esquistossômulo e verme adulto.

Produzido nas glândulas vitelínicas e no ovário, o ovo do *Schistosoma mansoni* tem como característica em sua constituição uma casca proteica e internamente diversas células vitelínicas (figura 6). Durante a sua formação inicial desde o ovário até a sua eliminação no meio (do primeiro ao quarto estágio de maturação), o ovo passa por diversas modificações. Na fase inicial, camadas finas da membrana citoplasmática interna do ovo intercalam-se entre a casca e as células vitelínicas. Ao passo do processo de maturação, essa membrana torna-se contínua separando a casca proteica das células vitelínicas, contornando internamente todo o conteúdo do ovo. Através da microscopia eletrônica de transmissão as células vitelínicas são destacadas por apresentarem em seus citoplasmas organelas essenciais como mitocôndria e retículo endoplasmático (CARVALHO et al. 2008).

Ao atingir seu último estágio de maturação, o ovo apresenta em seu interior o miracídio formado. Nessa fase, os ovos maduros possuem cerca de 150µm de comprimento por 60-65µm de largura de formato oval, destacando-se também o seu espículo ou espinho lateral formado pela camada externa na porção posterior do ovo. O tempo médio de vida dos miracídios dentro do ovo no tecido é de 20 dias, já no meio ambiente a sobrevivência varia de 2-5 dias sendo essencial o contato aquático para dá continuidade à sua evolução (BRASIL, 2014).

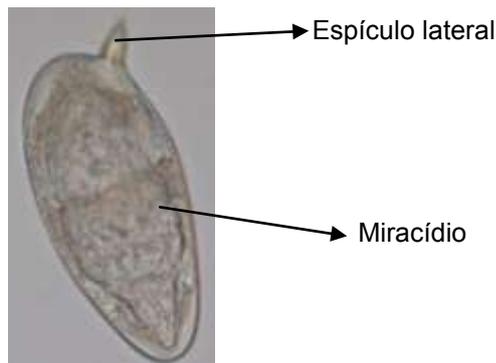


Figura 6- Ovo maduro de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Aidan Emery.SCAN/myspecies.info

O miracídio (figura 7) possui cerca de 160-180 µm de comprimento por 60 µm de largura e apresenta formato cilindrocônica. É constituído por placas epidérmicas ciliadas e anucleadas que juntamente ao seu sistema muscular auxiliam na motilidade no meio aquático. Na sua porção anterior está localizado o terebratorium, uma saliência apical em forma de cone, retráteis e não ciliados, que possui a porta para as glândulas de adesão e penetração e diversos receptores sensoriais. O miracídio apresenta um sistema excretor que elimina seus produtos e regula os líquidos interno. Esse sistema é formado por dois pares de células em flama ou solenócitos seguidos por túbulos coletores, finalizando-se nas laterais do corpo para o meio externo. Na sua porção posterior os miracídios possuem diversas células germinativas, os quais irão apresentar alta atividade durante a fase de esporocistos no interior dos moluscos (CARVALHO, et al. 2008).

Após a penetração no hospedeiro intermediário o miracídio passa por diversas modificações para dar início a formação dos esporocistos (figura 8). Após 2 horas de infecção, o miracídio sofre perdas significativas de suas estruturas, como cílios e placas epidérmicas, parte dos constituintes de suas glândulas e o terebratorium que perde sua forma.

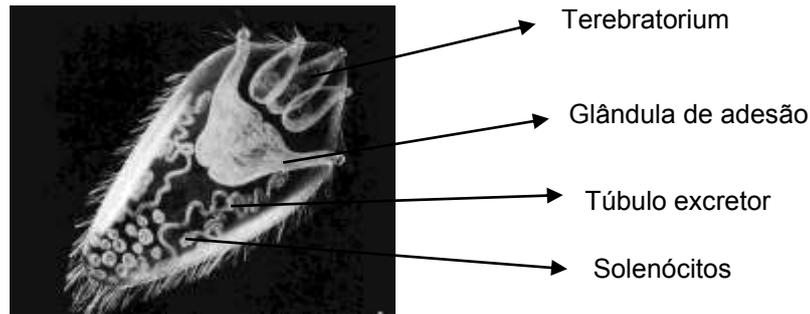


Figura 7- Miracídio *Schistosoma mansoni*. Fonte: Marty and Andersen, 1995.

Durante essa fase que antecede a formação completa do esporocisto primário ou mãe, o miracídio nessa fase pode ser facilmente eliminado por meio do sistema defensivo do molusco, pelo fato de estar desprovido de suas estruturas externas. Os miracídios que falham na formação do novo tegumento são envolvidos completamente por amebócitos e fibroblastos, evidenciando uma degeneração extensiva. O parasita que tem sucesso na formação completa do novo tegumento é envolvido por uma fina camada sincicial, cinco horas pós-infecção. Após 24 horas inicia a formação de microvilosidades ramificadas sobre a nova membrana externa que realiza trocas metabólicas e interage com o meio celular do hospedeiro. Ainda durante a formação do novo tegumento, vesículas abundantes em retículo endoplasmático rugoso (RER), complexo de Golgi e ribossomos surgem na sua superfície. Essas vesículas apresentam alta atividade de excreção proteica, que resultam na repulsão de fagócitos do hospedeiro. Diante disso, postula-se que essas vesículas possuem atividade protetora a ação dos amebócitos do molusco (CHIA-TUNG, 1996)

Após 72 horas de infecção o miracídio inicial perde suas características, destacando-se a nova membrana do esporocisto primário ou mãe, rica em ribossomos, polirribossomos, mitocôndrias, dentre outras organelas. Neste período as células germinativas do esporocisto mãe que inicialmente apresentavam-se imaturos, com núcleos proeminentes, pobre em heterocromatina e pouquíssimas organelas, tornam-se mais evidentes. Essas células costumam-se estar agrupadas ou isoladas, são ricas em mitocôndria, RER e Complexo de Golgi, e as divisões celulares podem ocasionalmente ser observadas. O esporocisto mãe torna-se mais alongado proporcionando espaço para o aumento do número de células germinativas. Após 4 dias, observa-se a formação de um prolongamento interno do tegumento originado a partir da membrana externa, em que parte dessas extensões passam a envolver as células germinativas. Seis dias após a infecção, as células

germinativas são completamente envolvidas pela nova membrana, que apresenta características similares ao da membrana externa, formando uma nova estrutura interna de forma esféricas contendo as células germinativas, dando origem ao esporocisto secundário ou filha. Essa nova estrutura sacular de células germinativas alonga-se à medida que ocorre o aumento no número de células que se diferenciam em cercárias. O processo de formação de um novo tegumento interno descrito na origem do esporocisto secundário ou filha pode ocorrer neste, resultando na continuidade de novas gerações de esporocistos (MEULEMAN et al. 1980).

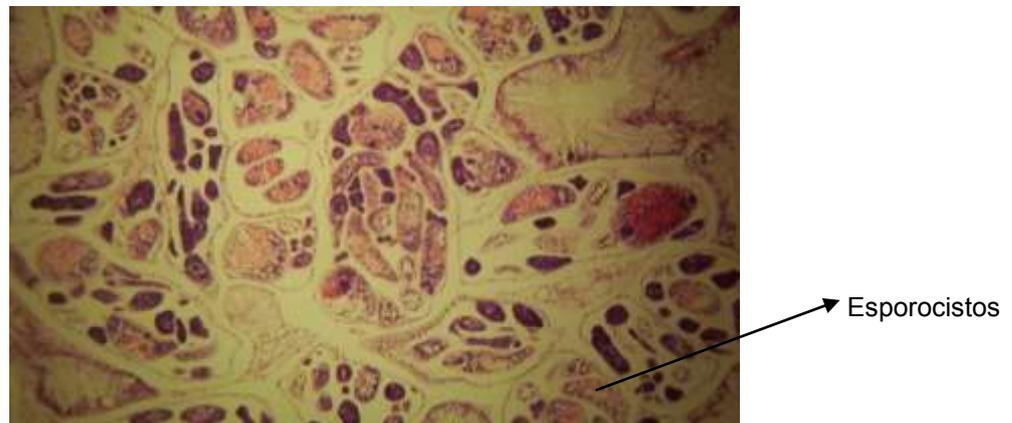


Figura 8- Esporcisto em corte histológico do tecido de caramujo *Biomphalaria glabrata*. Fonte: Universidade do Panamá.

A cercária (Figura 9) de vida livre tem aproximadamente 500 μm de comprimento, bem caracterizada pelas suas ventosas oral e ventral ou acetábulo e cauda bifurcada. O corpo cercariano possui em seu revestimento espinhos e grânulos que também são observados em toda extensão de sua cauda, e esta por ser um anexo que auxilia apenas na locomoção aquática e perde-se rapidamente, não possui órgãos descritos claramente. Internamente seguido ao tegumento, destaca-se a lâmina basal, fibras musculares circulares e longitudinais, corpos de inclusão e células subtegumentais (CAVALCANTI et al. 2009).

O tegumento cercariano é formado por um sincício de região citoplasmática anucleada unido diretamente a membrana basal contínua a corpos celulares nucleados mais interno ao parênquima. O citoplasma do tegumento sincicial é granular e possui diversos corpos de inclusão denominado do tipo cercária que postula-se estar envolvido na formação estrutural heptalaminada da bicamada lipídica na fase adulta do parasito. Subjacente, há uma membrana superficial

trilaminada com espessura de 7 nm revestida por uma estrutura filamentosa e fina, o glicocálix. Este é um complexo de moléculas glicídicas que auxiliam na integridade celular. No parênquima do corpo cercariano estão localizadas as células subtegumentais do tipo I, II, III e IV que são mais visíveis no estágio de esquistossômulo. A diferenciação dessas células é baseada em sua localização no corpo cercariano, tamanho e morfologia dos corpos de inclusão (DORSEY et al. 2002).

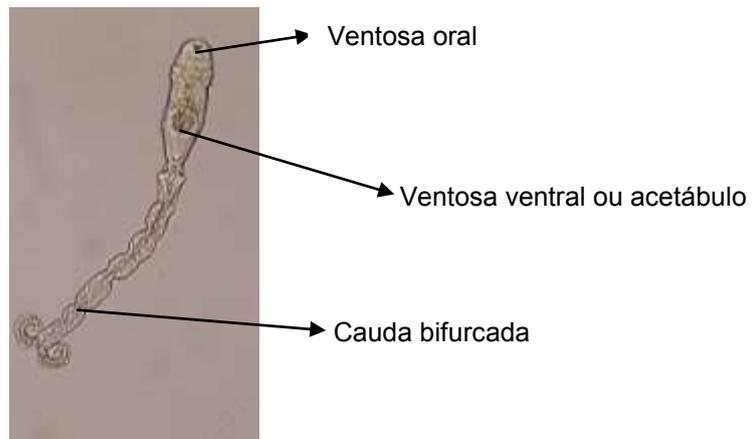


Figura 9- Cercária de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Do autor

O sistema nervoso da cercária é composto por um gânglio central, destacando-se por ser uma estrutura extensa que envolve a região anterior do esôfago até o ceco e seis pares de troncos nervosos. Também estão presente as papilas sensoriais, que são terminações nervosas que respondem aos estímulos químicos, mecânicos e térmicos. Distribuídos bilateralmente e simetricamente na porção oral e na cauda, totalizando aproximadamente 76 papilas sensoriais. O sistema osmorregulatório consiste em células tubulares alongadas com membranas ligadas através de desmossomos, possuem um núcleo definido e o citoplasma contendo vesículas e mitocôndrias distribuídos homoganeamente. Estão presentes nesse conjunto as células em flama ou solenócitos, que possuem forma irregular com um núcleo proeminente heterocromático, RER, complexo de Golgi, mitocôndrias e algumas vesículas. São organizados em 5 pares situados ao longo do corpo cercariano e 1 par na região anterior da cauda. Na porção anterior do corpo cercariano estão localizadas as células germinativas que se diferenciam na fase adulta, em vermes machos ou fêmeas. Comportam-se em forma de haste, possui

um núcleo heterocromático, o citoplasma rico em ribossomos, mitocôndrias, complexo de Golgi e RER (DORSEY et al. 2002; CARVALHO et al. 2008).

A transição de cercária de vida livre para esquistossômulo (figura 10) promove mudanças bioquímicas e morfológicas no processo de adaptação no hospedeiro definitivo. A invasão da cercária na pele do hospedeiro se dá através de suas glândulas especializadas, como as glândulas ventrais ou acetabulares e os corpos celulares subtegumentais. Após identificar o hospedeiro por meio de sinais químicos da pele como o ácido linoleico, a cercária utiliza sua glândula do complexo acetabular que auxilia na escolha de uma local propício a sua invasão, liberando posteriormente seu conteúdo enzimático, que também será relevante no processo migratório até os vasos sanguíneos. Apesar desse processo inicial ocorrer em alguns minutos (até 30 minutos), o intervalo da passagem do corpo cercariano da epiderme até a derme e vasos sanguíneos difere em relação aos hospedeiros (McKERROW et al. 2003; CURWEN et al. 2003; HE et al. 2005).



Figura 10- Esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Do

Nas primeiras 24 horas após a infecção, estudos em amostras de pele mostraram que mais de 80% dos esquistossômulos ainda permaneciam na epiderme, enquanto em ratos a taxa era cerca de 50%. Contudo, após 48 e 72 horas as taxas de esquistossômulo na derme da pele humana e próximos de vasos sanguíneos é em torno 60% e 71%, respectivamente. A medida que as barreiras são ultrapassadas, o esquistossômulo perde progressivamente o glicocálix e as suas glândulas acetabulares são esvaziadas (MCKERROW et al. 2002; HE et al. 2005). No quarto dia após a infecção ao atingirem a circulação sanguínea, os esquistossômulos migram da pequena circulação em direção ao pulmão e em

seguida, ao fígado por volta do décimo dia, os quais são alvos de mudanças morfológicas e fisiológicas. Durante essa passagem, os esquistossômulos apresentam o tegumento de tamanho aumentado e estriado chegando a medir cerca de 400 µm de comprimento com as extremidades revestidas por espinhos. O tubo digestivo também é alvo das alterações, o qual é dividido em seis estágios evoluindo de um pequeno ceco a um ceco bifurcado que se une após a ventosa ventral formando um único ceco. Chegando ao fígado, o ceco torna-se maior, cerca de três vezes, onde a ingestão de hemácias é evidenciada (PINTO et al. 1990; CARVALHO, et al. 2008). No sistema porta-hepático os vermes jovens iniciam o processo de maturação, sendo característico após 21 dias. Os vermes machos adultos possuem aparência esbranquiçada medindo em média 10 mm de comprimento e uma curvatura dorsoventral. Na porção anterior estão localizadas a ventosa oral e uma ventosa ventral ou acetábulo mais notável que a oral. A ventosa oral possui três sítios distintos: inferior, posterior e de fundo. Nessas áreas a ventosa possui um revestimento de espinhos finos, destacando-se um tegumento poroso nas áreas livre de espinhos e a presença de papilas sensoriais. O sistema digestivo tem início a partir da boca localizado no fim da ventosa oral. Unido a um esôfago curto que se bifurca a nível da ventosa ventral seguindo lateralmente ao corpo, unindo-se posteriormente em um único ceco (figura 11) (SILVA et al. 2008)

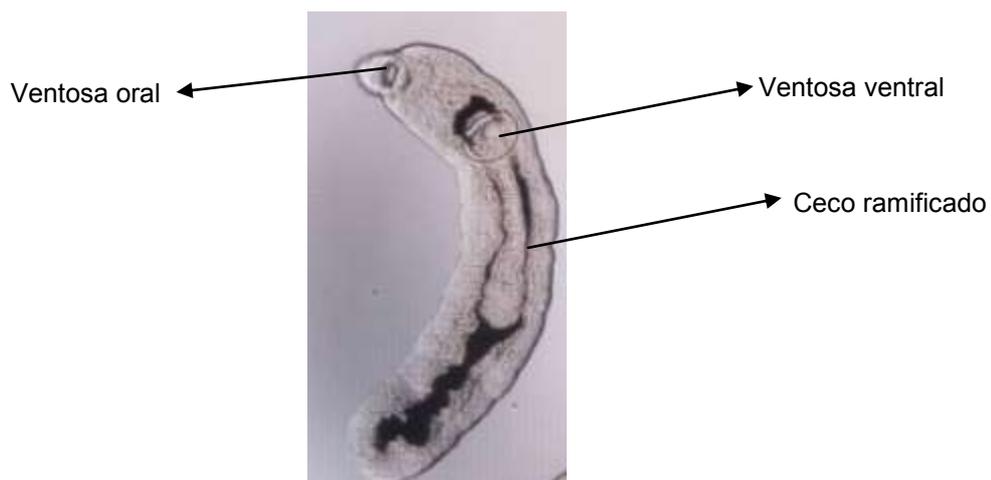


Figura 11- Verme jovem (21 dias) macho de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Do autor

O sistema reprodutor masculino é localizado na região ventral, o qual é diferenciado pela espessura do poro genital na margem inicial do canal ginecóforo (que alberga a fêmea) possuindo cerca de 7 a 8 lobos testiculares. A vesícula

seminal está unida ao poro genital por intermédio do ducto ejaculatório e unida ao testículo através do ducto deferente situado na porção final do canal ginecóforo. O verme macho é desprovido de órgão copulador, fecundado a fêmea por meio do envoltório do canal ginecóforo, onde os espermatozoides são liberados no poro genital alcançado a fêmea. Os túbulos coletores, que originam os ductos excretores, são unidos formando uma bexiga que se liga ao poro excretor na região posterior do corpo (figura 12) (MACHADO-SILVA *et al.* 1998; MACHADO-SILVA *et al.* 2003; MARTINEZ *et al.* 2003; NEVES, 2005).

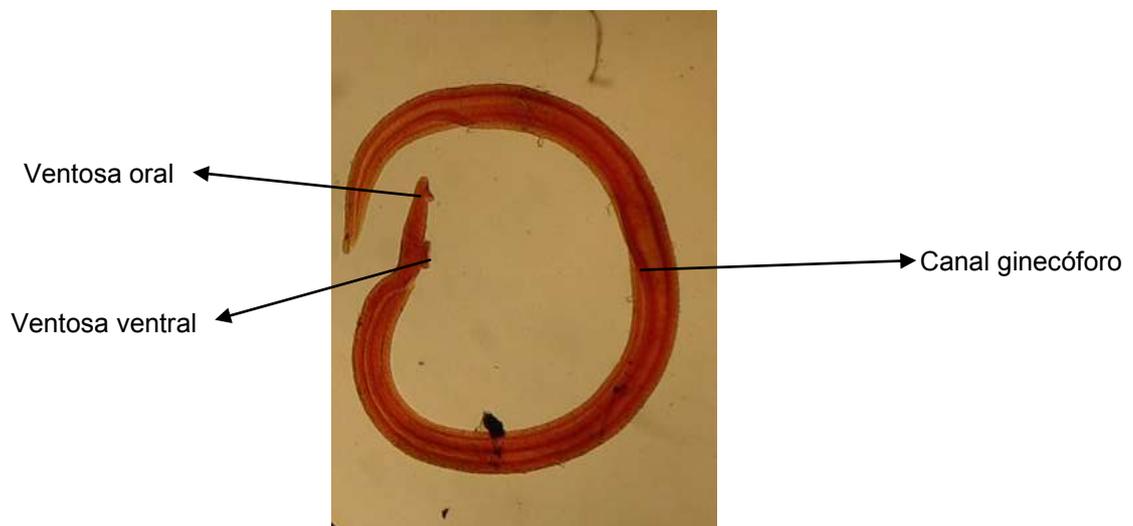


Figura 12- Verme adulto macho de *Schistosoma mansoni*. Fonte:Universidade do Panamá

As fêmeas adultas (figura 13) têm em média 15 mm de comprimento, possuem uma ventosa oral e ventral ou acetábulo de tamanhos inferiores comparadas aos do macho e são filiformes. A superfície do seu tegumento é menos complexa, lisa e de aparência translúcida permitindo a visualização de uma coloração castanha devido a ingestão de hemácias e o consequente metabolismo da hemoglobina em hemozófina. O sistema digestivo feminino não possui diferenças das descritas do verme macho adulto. O sistema reprodutor inicia-se por uma vulva, localizada abaixo do acetábulo, seguida pelo útero, oótipo e ovário. As glândulas vitelínicas ocupam a maior parte do corpo da fêmea e são constituídas por células vitelínicas que diferem em tamanho e função na participação de formação da casca do ovo. O oótipo é caracterizado por apresentar células epiteliais cuboides, musculatura longitudinal e circular, os quais participam na morfologia do ovo. O oótipo é ainda envolvido por células glandulares que resultam na glândula de Mehlis, sendo uma de suas funções estimular as células vitelínicas a sintetizarem o material

formador da casca do ovo (MONÉ e BOSSIER, 2004; CARVALHO et al. 2008; PEREIRA et al. 2013).

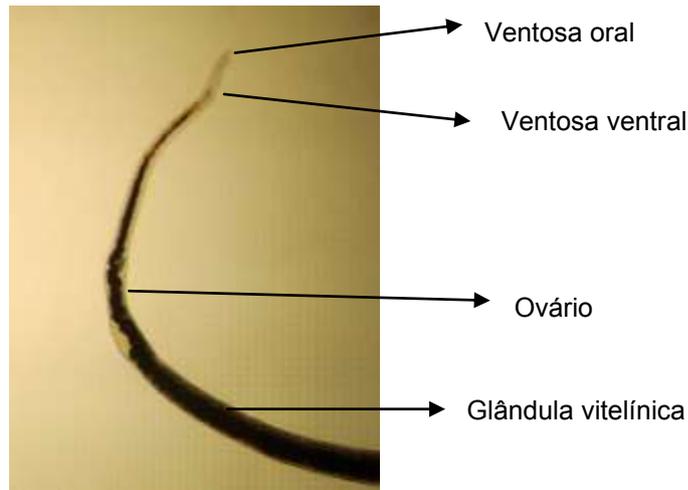


Figura 13- Fêmea adulta de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Do autor

2.2.2 Ciclo biológico

O ciclo biológico do *Schistosoma mansoni* (figura 14) requer passagens indispensáveis em dois hospedeiros, um definitivo sendo representado pelo homem no qual ocorre a reprodução sexuado dos vermes adultos, e um intermediário representado pelo molusco do gênero *Biomphalaria* onde ocorre a reprodução assexuada, sendo dessa forma categorizado por um ciclo complexo do tipo heteroxênico.

As fases larvares em meio aquático são responsáveis por infectar ambos hospedeiros. O homem infectado albergando casais de *Schistosoma mansoni* libera em suas fezes ovos maduros contendo em seu interior o miracídio, larva responsável por infectar o molusco *Biomphalaria*. Uma vez em contato com a água e as condições favoráveis (luminosidade constante e intensa, temperatura média de 28°C e boa oxigenação) o ovo maduro eclode liberando o miracídio que nada ativamente com auxílio das suas estruturas ciliares em busca do hospedeiro intermediário (BARBOSA et al. 2000; NEVES, 2005).

O encontro do miracídio com os caramujos se dá por mecanismos quimiotáticos, os quais liberam substâncias que são detectadas através do *terebratorium* ou da papila apical dos miracídios. O contato miracidiano ao tecido do caramujo induz o *terebratorium* a assumir forma de ventosa, ocorrendo em seguida a liberação do conteúdo da glândula de adesão. O miracídio pelos seus movimentos rotatórios e contráteis iniciam o processo de invasão, que simultaneamente, as glândulas de penetração liberam enzimas proteolíticas que auxiliam na digestão dos tecidos moles do caramujo até se estabelecerem no tecido subcutâneo. Todo o processo de penetração dura em média 10 a 15 minutos (NEVES, 2005).

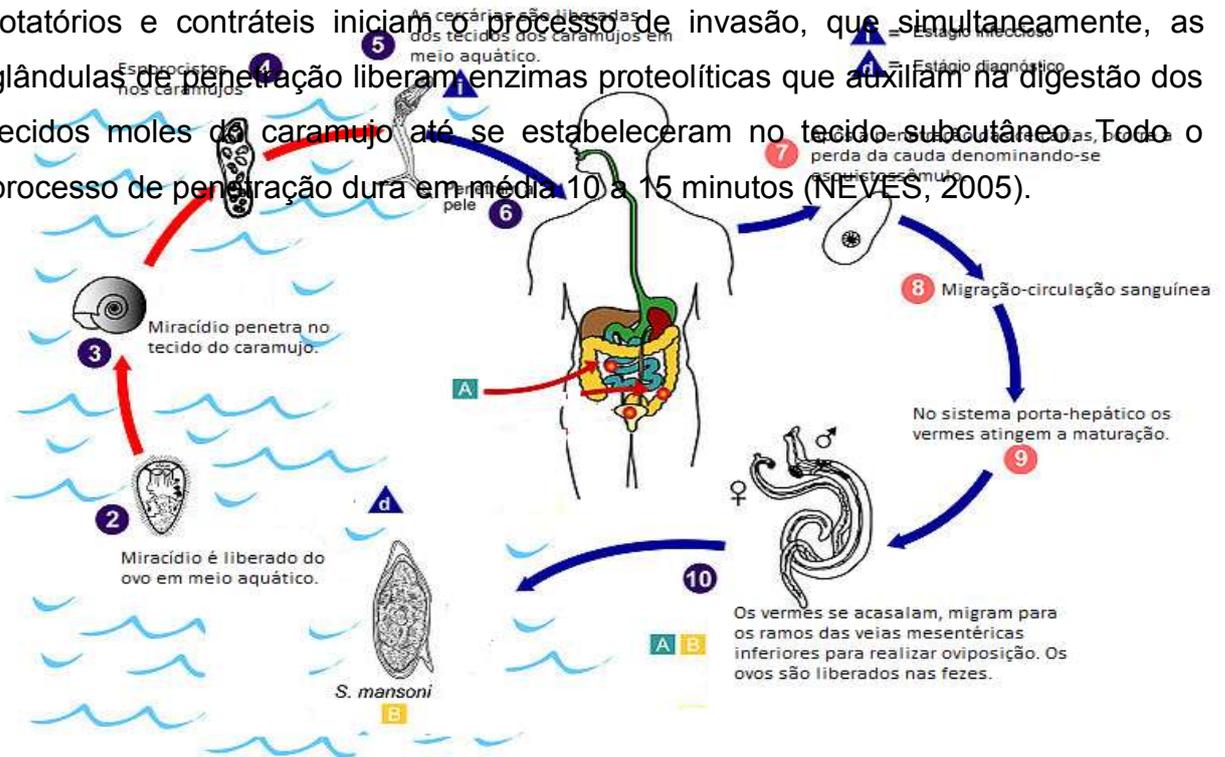


Figura 14-Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*. FONTE: Adaptado de dpd.cdc.gov, 2012.

No tecido do caramujo, os miracídios continuam em processo de desconexão estruturais (cílios, *terebratorium* e musculatura subepitelial) resultando numa estrutura sacular contendo células germinativas que assexuadamente replicam-se gerando os esporocistos I ou mãe e no 14º dia após a infecção resultam nos esporocistos II ou filhos, que se diferenciam em cercárias. A completa formação cercariana e sua liberação no meio aquático ocorre após 30 dias da infecção dos

caramujos. Cada miracídio, que já tem o sexo definido das cercárias, pode gerar em média cerca de 100 a 300 mil cercárias (NEVES, 2005; GRYSSELS et al. 2006).

As fases de diferenciação cercariana ocorrem nos espaços mais parasitados, como nas glândulas digestivas, ovotéstis e túbulo renal. A saída das cercárias dos caramujos, denominada de emergência cercariana, é influenciada predominantemente por estímulos externos como luz e temperatura. A passagem das cercárias para o meio externo também se dá pela formação de vesículas, que auxiliam na migração por diversos tecidos do caramujo. As cercárias são descritas por apresentarem glândulas, ainda no interior do hospedeiro intermediário, as quais acredita-se facilitar a sua saída na fase de emergência cercariana, denominando-as de glândulas de escape (COELHO e BEZERRA, 2006).

No meio aquático, as cercárias nadam ativamente em busca do hospedeiro definitivo. O tempo médio de vida cercariana é cerca de 36-48 horas, apresentando maior capacidade infectante nas primeiras 8 horas de vida. A manutenção das cercárias na superfície aquática está diretamente relacionada aos fatores como luz, temperatura e gravidade, contribuindo para uma maior probabilidade de encontrar o hospedeiro. Ao entrar em contato com a pele do homem as cercárias passam por mudanças comportamentais nas fases de adesão, penetração e migração. A adesão das cercárias se dá pela ação da secreção mucoproteica pelas ventosas acetabulares promovendo a fixação da ventosa oral. Ao aderir-se, as cercárias rastejam pela extensão cutânea em busca de irregularidades nas escamas epidérmicas. Concomitante a esse processo, ocorre a liberação do conteúdo enzimático das glândulas de penetração com ação proteolítica que em conjunto a ação mecânica rotatória e intensa facilitam a passagem do corpo cercariano à superfície epidérmica e perda caudal. Esse processo pode durar em média 15 minutos (BRACHS e HASS, 2008; HAEBERLEIN e HASS, 2008).

Ao chegar na derme o corpo cercariano, denominado nesta fase de esquistossômulo de pele, migra para os tecidos mais profundos em busca dos vasos linfáticos ou venosos. Os esquistossômulos passam por uma série de modificações bioquímicas e fisiológicas em um processo de adaptação ao novo ambiente. Como a conversão do tegumento trilaminar em uma estrutura heptalaminar e a troca do metabolismo oxidativo para o anaeróbio facultativo. A membrana heptalaminada tem um papel de aderir-se as diversas proteínas do hospedeiro, favorecendo, dessa forma, o parasito em “mascara-lo” frente aos mecanismos imunológicos. Ao acessar

os vasos linfáticos ou venosos, os esquistossômulos seguem da pele para os pulmões, onde são carregados pelo fluxo sanguíneo venoso para o coração direito chegando aos pulmões via artéria pulmonar, sendo conhecidos nessa etapa de esquistossômulos pulmonares. O aumento do número de esquistossômulos no pulmão pode ocorrer entre o segundo e oitavo dia após infecção (SKELLY e WILSON, 2006; NEVES, 2005).

Os esquistossômulos têm a sua completa maturidade nos vasos intra-hepáticos, e até atingir seu habitat final enfrentam diversos obstáculos. Na literatura há a descrição de quatro possíveis vias: intravascular direta sem recirculação; intravascular direta com recirculação; intravascular reversa; e transdiafragmática. Destas, a via intravascular direta com recirculação é a mais aceita e a melhor comprovada. Os esquistossômulos antes de adentrarem as artérias que conduzem ao sistema porta-hepático, passam pela circulação pulmonar-sistêmico. Das veias pulmonares, os vermes são levados para a câmara esquerda do coração, e em seguida bombeados para a aorta. Da região aórtica os esquistossômulos podem ter acesso ao sistema hepático por duas vias principais: artéria hepática ou artéria mesentérica. Durante esse percurso, acredita-se que os vermes migrem pelo leito capilar sistêmico regressando a circulação venosa, repetindo todo o processo migratório, para assim, terem acesso ao sistema porta-hepático. (MILLER e WILSON, 1980; WILSON e COULSON; 1986; WILSON, 2009).

No interior dos vasos hepáticos, os esquistossômulos são induzidos ao processo de maturação entre os períodos de 10 a 20 dias após infecção. Nesse mesmo período, os vermes já são caracterizados por terem como fonte de nutrientes o material sanguíneo, e também são evidenciados pelo aumento do volume corporal. Em média, na terceira semana os vermes seguem acasalados para as veias mesentéricas inferiores, onde iniciam a oviposição na parede intestinal entre 30º e o 34º dia de infecção (WHEATHER e WILSON, 1979; BRENER et al. 1956).

Os ovos recém liberados não apresentam o miracídio totalmente formado, necessitando assim passar por etapas de maturação (1º ao 5º estágio), processo este que dura em média 6-7 dias à medida que atravessam o tecido intestinal em direção ao lúmen. Os ovos maduros do *Schistosoma mansoni* são vistos no material fecal em 42-45 dias de infecção. No meio externo, os ovos necessitam entrar em contato com a água que juntamente aos fatores determinantes (luz, temperatura, umidade) promova a eclosão e liberação do miracídio que segue em busca do seu

hospedeiro intermediário, dando continuidade ao reinício do seu ciclo biológico. No ambiente os ovos podem permanecer viáveis por alguns dias, cerca de 4 a 5, desde que permaneçam em lugares úmidos. Os quais podem ser carregados até uma coleção hídrica (NEVES, 2005; BRASIL, 2014).

2.2.3 Patogenia

O quadro clínico da esquistossomose é dividido em duas fases: aguda e crônica. A infecção nas áreas endêmicas geralmente são assintomáticas e podem progredir provocando alterações hepatointestinal. A forma crônica mais grave da esquistossomose é caracterizada pela hepatoesplenomegalia e evolução da hipertensão portal (NEVES, 2011).

As reações agudas da esquistossomose iniciam a partir do contato e a invasão do corpo cercariano e persiste até 120 dias após a infecção. Dentre as manifestações clínicas mais comuns incluem-se a erupção cutânea provocada pela penetração do corpo cercariano que pode persistir por algumas horas após a infecção, a dermatite de início retardado manifestado como urticária ou angioedema que pode durar entre 1 a 12 semanas. Ainda na fase aguda, a síndrome ou febre de Katayama é um distúrbio caracterizado pela reação de hipersensibilidade sistêmica devido a migração dos esquistossômulos e ovos que ocorrem entre 14-84 dias após a infecção primária. Os sintomas gerais incluem febre, cefaleia, perda de peso, hepatomegalia, mialgias generalizadas, diarreias acompanhadas ou não por sangue, eosinofilia e infiltrações pulmonares gerando distúrbios no sistema respiratório (NEVES, 2011; JAURÉGUIBERRY et al. 2009; ROSS et al.2002).

O quadro crônico da esquistossomose é destacado pelas reações imunológicas provocadas pelos antígenos (SEA-Antígeno de Ovo Solúvel) presentes nos ovos de *S. mansoni*. A resposta imune frente a esse alérgeno resulta na formação de granulomas e tecidos fibróticos atingindo principalmente o tecido intestinal e o fígado, cuja a intensidade dessas alterações estarão relacionadas a quantidade de antígenos presentes. A nível intestinal, a fibrose do tecido leva a uma diminuição do peristaltismo e constipações frequentes gerando entre os pacientes esquistossomóticos queixas de dores abdominais e fezes mucossanguinolentas que estão associadas a intensa passagem dos ovos para o lúmen intestinal (ROSS et al. 2007).

As mudanças provocadas no fígado têm início a partir da oviposição com a formação de granulomas agravados pelo número de ovos que chegam ao órgão. A reação granulomatosa gera a inflamação perisinusoidal e fibrose periportal caracterizando a “fibrose de Symmers”. Nesse modo, as alterações teciduais provocam a obstrução dos ramos intra-hepáticos da veia porta resultando na hipertensão portal que pode ser intensificada com a evolução do quadro levando a outros distúrbios. Dentre estes distúrbios destaca-se a esplenomegalia causada pela reação imunoalérgica resultando em hiperplasia do baço associado ao aumento do número de células do sistema monocítico fagocitária; as formações de varizes esofagianas também são observadas nos quadros avançados. Esses vasos são formados com o intuito de compensar a hipertensão portal na tentativa de normalizar a circulação portal obstruída pela fibrose hepática. Muito dessas varizes são sensíveis e com alto risco de se romperem provocando hemorragia que pode ser fatal. A ascite conhecida como “Barriga D’água” é observada no quadro clínico avançado e crítico da esquistossomose da fase crônica sendo resultante das alterações hemodinâmicas da circulação portal (ROSS et al. 2007; ROSS et al. 2002).

2.2.4 Tratamento

A busca por quimioterápicos esquistossomicida tem sido estudado por longos anos. Os compostos sintéticos derivados dos sais de antimônio e o lucantone, pertencente aos tioxantenos, são exemplos de alguns fármacos que foram utilizados no tratamento da esquistossomose entre as décadas de 20 e 40. No entanto, os efeitos adversos observados a longo prazo implicaram no abandono de seu uso na terapêutica (CARVALHO et al. 1982; NOVAES *et al.* 1999). O oxaminiquine um derivado amino-metil-tetrahidroquinoleínicos foi bastante utilizado na década de 70 destacando-se pela sua eficácia, principalmente contra machos de *Schistosoma mansoni*, e efeitos adversos mais brandos. Entretanto, por ser ativo apenas contra uma espécie de *Schistosoma* a sua comercialização foi extinta com o advento do praziquantel, o qual vem sendo utilizado nos dias atuais (FERREIRA *et al.* 2003).

O praziquantel (PZQ) foi descrito pela primeira vez em 1972 e foi desenvolvido primariamente para o uso veterinário no tratamento contra cestódeos, como a *Taenia* sp. Tem sido destacado pela baixa toxicidade, alta eficácia e

tolerabilidade. Dessa forma, por atender os requisitos exigidos pela OMS na década de 80 o seu uso foi expandido para o tratamento da esquistossomose e outros cestódeos em humanos (SILVA et al.2017; WATSON, 2009).

O PZQ é um derivado pirazinoisoquinolona (Figura 15), um composto quiral insolúvel em água. Destaca-se por ser um fármaco potente com um amplo espectro de ação antihelmíntico, principalmente frente a todas as espécies de *Schistosoma*. Sua ação esquistossomicida é limitada sendo ativo apenas contra vermes adultos por razões ainda não conhecidas (SILVA et al. 2017; CIOLI et al.2014).

O mecanismo de ação do praziquantel ainda não é totalmente esclarecido, porém as hipóteses mais aceitas apoiadas em estudos moleculares descrevem a importância dos canais de cálcio dependentes de voltagem (VGCC) em provocar alterações do nível intracelular do Ca^{++} resultando nos diversos eventos celulares, como a contração da musculatura, expressão de genes e liberação de neurotransmissores (SALVADOR-RECATALA et al. 2008; JEZIORKSI e GREENBERG, 2006; GREENBERG, 2005).

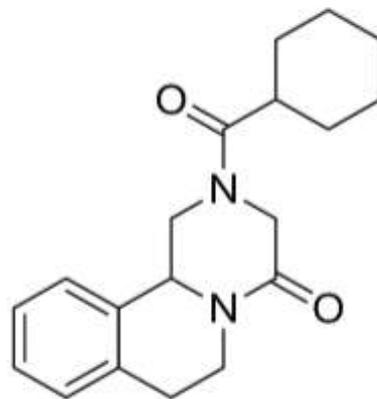


Figura 15. Estrutura molecular do Praziquantel. Fonte: SILVA et al. 2017.

O surgimento de cepas de *Schistosoma* resistentes ao PZQ tem sido considerado como um fator preocupante, já que é o único fármaco de escolha no tratamento da esquistossomose. Esta problemática tem se tornado tema de discussão no que tange ao seu uso indiscriminado, especialmente em regiões endêmicas unido ao alto risco de exposição as reinfecções. Gerando assim, a necessidade pela busca de novas alternativas terapêuticas (WANG et al. 2012; DOENHOFF et al. 2008; SABRA e BOTROS, 2008; BOTROS et al. 2005).

Os países africanos estão entre os mais relatados na literatura em casos isolados de resistência, e este fato está associado ao elevado índice da doença na região e ao uso repetido do praziquantel para controlá-la (DOENHOFF et al. 2009). Em comunidades do Delta do Nilo no Egito foram relatados pacientes que apresentaram ovos viáveis em suas fezes, mesmo após serem tratados com três doses padrões consecutivos. Para uma investigação mais detalhada em laboratório, os ovos de *Schistosoma mansoni* isolados desses pacientes foram utilizados para realização de testes em modelo murino. Os resultados obtidos foram similares, 80% dos animais permaneceram com ovos viáveis em suas fezes (ISMAEL et al. 1999). Um estudo similar por Melman e colaboradores (2009) realizado no Quênia também revelou um grau de resistência *in vivo* e *in vitro* a partir de cepas isoladas de amostras fecais de pacientes que foram submetidos a repetidas doses do PZQ.

Novos métodos laboratoriais têm demonstrado uma indução de resistência ao PZQ baseando-se no tratamento sucessivo de caramujos *Biomphalaria glabrata* infectados. O resultado do ensaio *in vitro* mostrou uma elevação da ED₅₀ contra vermes adultos obtidos a partir da cepa de caramujos previamente tratados comparados aos não tratados. Evidenciando novas rotas de aquisição de resistência ao praziquantel (COUTO et al. 2011).

Desse modo, é de extrema importância a busca por novos fármacos esquistossomicida, visto que em regiões extremamente endêmicas a exposição do PZQ para o tratamento da esquistossomose ocorre em massa e de forma repetida. Despertando a problemática quanto ao surgimento de cepas resistentes.

2.3 β -Lapachona

A β -lapachona (Figura 16) (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona) é uma naftoquinona lipofílica e análoga semissintética obtida através do lapachol extraído da casca de árvores da família Bignoniaceae (*Tabebuia* sp.), podendo ainda ser encontrado em outras famílias como a Verbenaceae e Proteaceae (PINTO e CASTRO, 2009). As árvores *Tabebuia* sp. no Brasil são conhecidas como “pau d’arco ou Lapacho” ou ainda ipês. Na região nordeste, a sua casca é bastante utilizada na medicina popular como analgésicos, anti-inflamatório, antineoplásico e diurético (HUSSAIN et al. 2007). O lapachol foi isolado pela primeira vez por Paternò em 1982 de árvores *Tabebuia avellanedae*, e

posteriormente Hooker padronizou o método para obtenção da β -lapachona e ainda determinou a sua estrutura molecular. Além disso, a β -lapachona também pode ser sintetizada a partir do lomatiol, presente nas sementes de plantas da família Proteaceae oriunda da Austrália (EYONG et al. 2015; GUPTA et al. 2002).

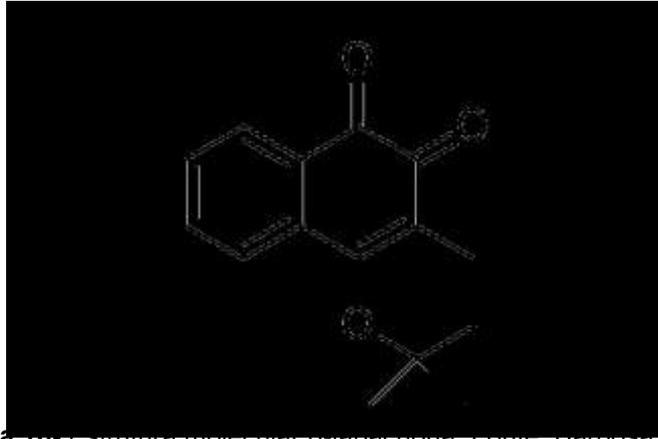


Figura 16- Estrutura molecular β -lapachona. Fonte: Barbosa e Neto, 2013.

As naftoquinonas fazem parte do grupo das quinonas, as quais são caracterizadas por serem um grupo de substâncias orgânicas semivoláteis, geralmente apresentam coloração e estão em constante presença na natureza. A estrutura básica das quinonas é determinada por dois grupamentos carbonilas em um anel insaturado de seis átomos de carbono, centrados em posições “orto” ou “para” (SOUSA et al. 2016).

O modelo laboratorial para a síntese da β -lapachona, contribuída por Paternò e Hooker, baseia-se a no seu caráter básico como ilustrado na figura 17. Ao sofrer a ação do H_2SO_4 , o meio ácido promove a ciclização do lapachol resultando na formação do carbocátion terciário pela reação de adição à ligação dupla da cadeia lateral. A reação ao ser diluída em água libera a molécula da β -lapachona, sendo esta precipitada no meio. Ao microscópio o composto assemelha-se a cristais aciculiformes e de coloração alaranjada visível a olho nu (BARBOSA e NETO, 2013).

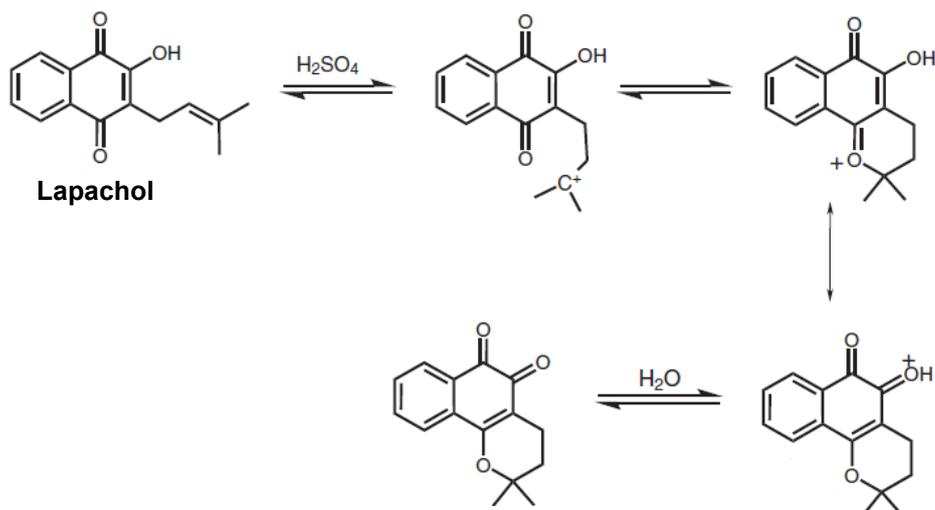


Figura 17- Ciclização do lapachol e formação da β -lapachona. Fonte: Barbosa e Neto,

Embora apresente um amplo espectro, o mecanismo de ação da β -lapachona não é totalmente elucidado. O seu papel citotóxico está estritamente relacionado ao ciclo redox das quinonas que resulta em estresse oxidativo (figura 18). Nessa rota as quinonas são alvos da enzima citocromo NADPH-P450 redutase, levando a redução de um elétron resultando-as em semiquinona, forma instável e reativa. As semiquinonas geradas podem ainda transferir um elétron para moléculas de oxigênio (O_2) gerando superóxidos ($O_2^{\cdot-}$), e estes passam a ser alvos da superóxido dismutase convertendo-os em peróxidos de hidrogênio (H_2O_2). Os radicais hidroxilas (OH^{\cdot}) podem ainda serem formados em paralelo pela reação de Fenton catalisada pelo ferro ferroso (Fe^{2+}). Todos esses radicais livres podem reagir com as macromoléculas celulares, como as proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos resultando em morte celular (PINK et al. 2000; VILLAMIL et al. 2004; SOUSA et al. 2016).

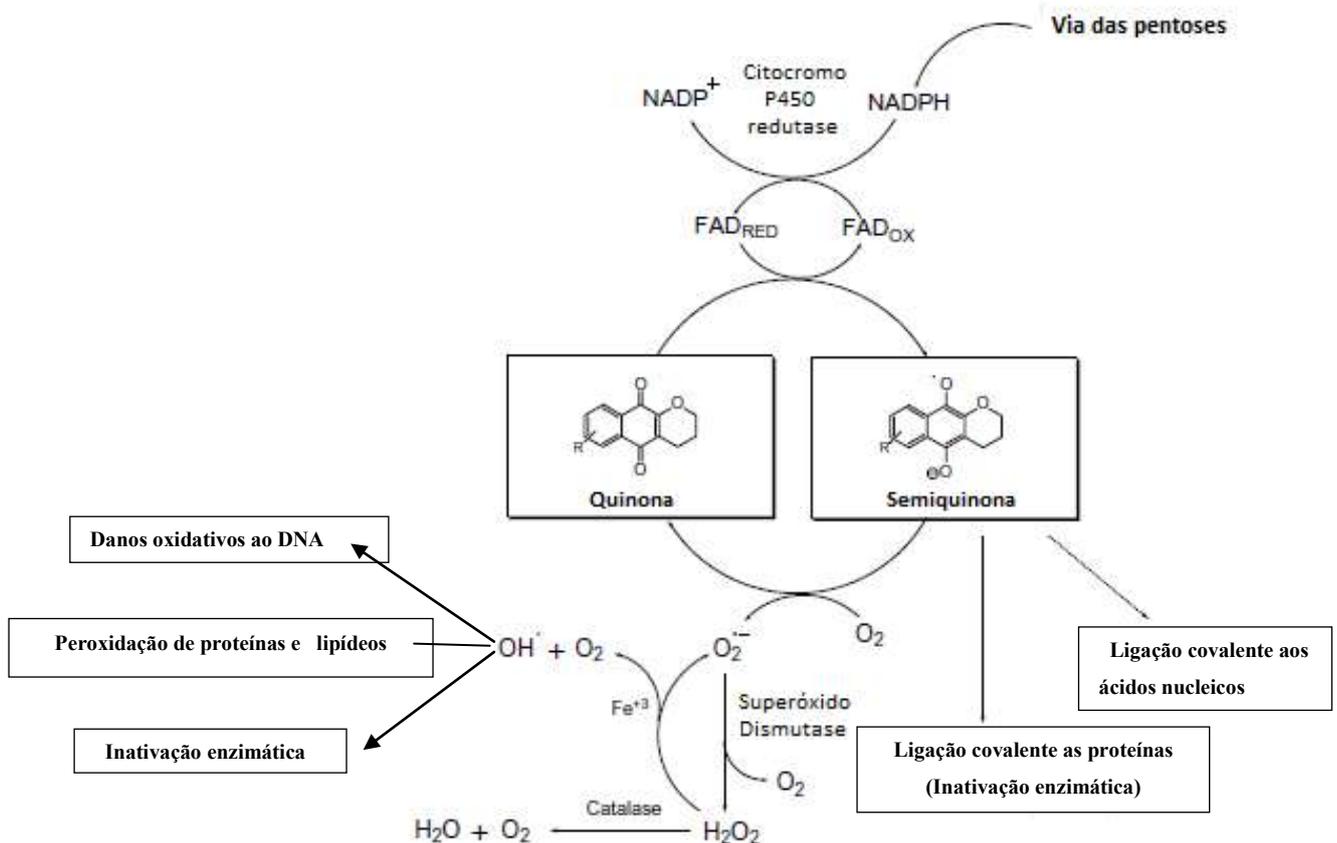


Figura 18- Ciclo Redox das quinonas. Fonte: Salas et al., 2008. Adaptado.

As quinonas também podem ser reduzidas pela ação da NAD(P)H:Quinona oxirredutase 1(NQO1). A NQO1 é uma flavoproteína encontrada em células eucarióticas, sendo expressa de forma variável em humanos e altamente expressa no tecido hepático de muitos mamíferos. Além disso, a NQO1 é altamente expressa em células tumorais como em câncer de mama, colón e pulmão. O papel funcional da NQO1 é conhecido pela sua ação de detoxificação de xenobióticos como as quinonas, as quais são reduzidas em dois elétrons gerando a hidroquinona, forma conjugável para ser excretada da célula e protege-la dos mecanismos de danos celulares.

Embora apresente no papel de proteção celular, a NQO1 pode reduzir outras quinonas, incluindo a β -lapachona, para sua forma mais reativa e esse mecanismo é apoiado por meio de estudos moleculares em células cancerígenas que possuem genes altamente expressos para esta enzima. Ensaio *in vitro* com células cancerígenas da linhagem HepG2 (Carcinoma hepatocelular) evidenciaram o papel da β -lapachona na formação de radicais livres através da ação da NQO1. A forma reduzida de hidroquinona pode se auto-oxidar e retornar a sua forma estrutural inicial, e provavelmente essa conversão ocorre pela formação intermediária da semiquinona, a qual pode ser conduzida para o ciclo redox e gerar a formação dos radicais livres e conseqüentemente provocar danos celulares. Células de tecidos saudáveis tem mostrado baixos níveis de NQO1 comparado a células cancerígenas, entretanto o tropismo da β -lapachona por células tumorais ainda precisa ser esclarecido (PINK et al. 2000; COLUCCI et al. 2007; LI et al. 2014).

Um outro papel a ser ressaltado da β -lapachona está na sua capacidade de induzir a morte celular via apoptose. A morte celular programada pode ser ativada por diversos fatores como vírus, hipóxia, radiações ionizantes, radicais livres, entre outros. Choi e colaboradores (2002) e Woo e colaboradores (2006) evidenciaram o papel indutor da β -lapachona em ativar os mecanismos da apoptose em células cancerígenas. As quais tiveram aumento da fosforilação da p53 que além de provocar retardo mitótico, inibe a expressão dos genes IAP (Proteínas Inibidoras da Apoptose) mantendo o nível das caspases 3 e 9 elevadas e induzem os genes da BAX aumentando a síntese de proteínas pró apoptóticas. Yu e colaboradores (2014) além de confirmarem esses achados, evidenciaram em células do carcinoma

gástrico que a β -lapachona foi capaz de inibir a via PI3K/Akt. Esta via tem se tornada alvo de pesquisa em células neoplásicas, visto que é a responsável pela proliferação e sobrevivência celular por meio da inibição de proteínas pró apoptóticas e indução das proteínas antiapoptóticas.

Atualmente, a β -lapachona já é um candidato de estudo clínico de fase II para o tratamento de tumores sólidos e diversos estudos têm contribuído para o seu destaque, como atividade antimetastática (KEE et al. 2016), antiangiogênica (WU et al. 2016), ativa contra células cancerígenas da próstata, pâncreas, pulmão e cólon (HUSSAIN e GREEN, 2017). Diante do seu potente efeito antitumoral, surgiu o interesse de se investigar a atividade da β -lapachona frente a outros alvos biológicos e já tem se mostrado promissor como antibacteriano (MACEDO et al. 2013), anti *T.cruzi* (SALAS et al. 2008; ANJOS et al. 2016), antifúngico (BRILHANTE et al. 2016), foi ativo contra larvas de *Toxocara canis* (SANTOS et al. 2015) e anti *Schistosoma mansoni* (AIRES et al. 2014).

Assim, considerando todas as atribuições aplicadas a β -lapachona, é de grande interesse a continuação de mais estudos desta molécula. Visto que na sua forma livre a β -lapachona foi ativa *in vitro* contra vermes machos adultos conforme Aires e colaboradores (2014), propomos avaliar a atividade *in vitro* da β -lapachona no complexo de inclusão β -ciclodextrina contra os diferentes estágios evolutivos de *Schistosoma mansoni* associada ao PZQ. Visando enquadrá-la como um candidato alternativo para o tratamento da esquistossomose minimizando o uso integral do praziquantel contribuindo para a manutenção de sua eficácia.

2.4 Ciclodextrina

As ciclodextrinas fazem parte da família de oligossacarídeos cíclicos compostos por seis ou mais unidades de glucopiranosas unidas por ligações glicosídicas. A descoberta das moléculas de ciclodextrina ocorreu no século XIX pelo cientista francês Villiers e ao longo de muitas pesquisas, apenas em 1976 foi liberado o primeiro medicamento complexado a ciclodextrina. Hoje a aplicação industrial das ciclodextrinas vem sendo utilizada de forma massiva em medicamentos, cosméticos e alimentos, graças as vantagens atribuídas à molécula (KURKOV e LOFTSSON, 2012).

As moléculas de ciclodextrina são derivadas da reação enzimática envolvendo a CD glucanotransferase (CGTase) com o amido resultando em produto cristalizado. As formas mais comuns de serem encontradas são a α -ciclodextrina, β -ciclodextrina e γ -ciclodextrina, as quais possuem respectivamente 6, 7 e 8 unidades de glucopirranose (figura 19). A estrutura molecular da ciclodextrina destaca-se pelo seu perfil hidrofílico na porção externa e apolar internamente, essa singularidade a torna capaz de formar complexos de inclusão com moléculas hidrofóbicas, sendo assim encabeçada como um novo excipiente farmacêutico (LAI *et al.* 2017; TIWARI *et al.* 2010).

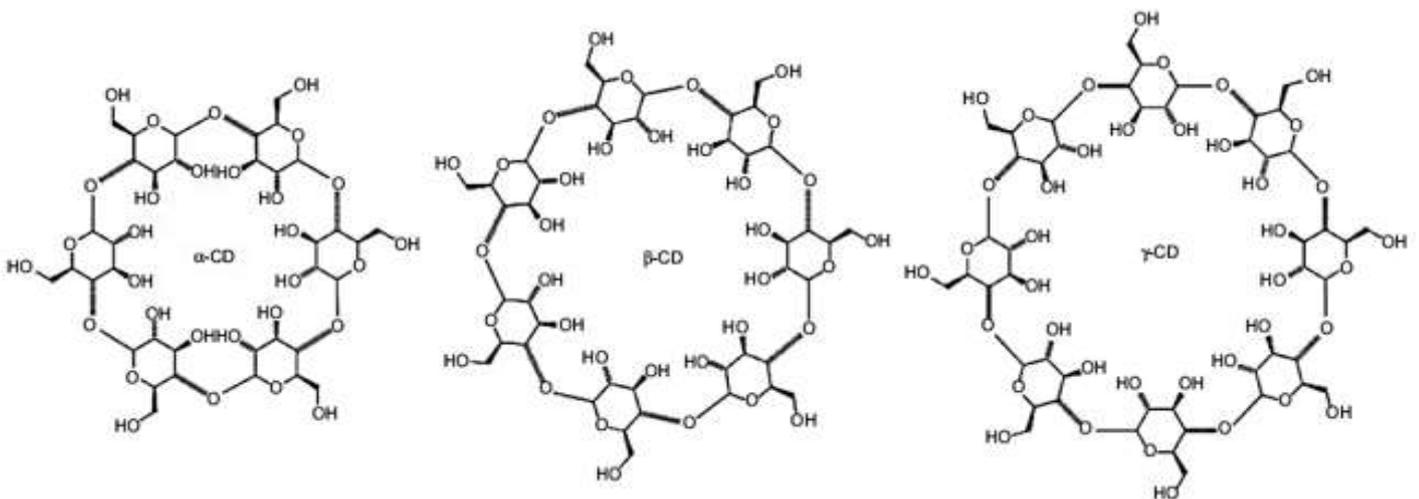


Figura 19- Classificação das ciclodextrinas. Fonte: Laza-Knoerr et al., 2010.

A finalidade no uso de excipientes farmacêuticos está em conduzir e disponibilizar a quantidade necessária da droga dentro do tempo esperado de forma segura e eficaz, minimizando os efeitos indesejáveis atribuídas as propriedades físico-química das moléculas. As ciclodextrinas vem sendo um dos excipientes mais estudados e amplamente aplicadas na indústria farmacêutica. Além de melhorar a solubilidade de certos fármacos, a ciclodextrina vem sendo utilizada para reduzir irritações gastrointestinal ou ocular, eliminar sabores e cheiros desagradáveis e evitar a interação medicamentosa. Quanto as considerações toxicológicas, a ciclodextrina é bem tolerada e não tóxica nas diversas vias de administração (oral, transdérmica, ocular, parenteral), com exceção da α e β -ciclodextrina, as quais não são recomendadas pela via parenteral (TAWARI et al. 2010; JAMBHEKAR e BREEN, 2016).

A grande e principal característica pela qual as moléculas de ciclodextrina são destacadas, é a sua capacidade de formar complexos de inclusão, que resulta em “aprisionamento” das moléculas na cavidade interna das ciclodextrinas (figura 20). Dois fatores chaves são levados em considerações para que essa interação ocorra: a primeira refere-se ao tamanho da molécula que deseja-se complexar, a qual deverá caber na cavidade lipofílica da ciclodextrina, e a segunda é a presença de uma força motriz que seja favorável a internalização do composto. O espaço apolar das ciclodextrinas é determinado pelo número de unidades da glucopiranosose, enquanto a sua altura é similar para todos os tipos. Desse modo, a α -ciclodextrina pode complexar moléculas de baixo peso molecular, a β -ciclodextrina compostos aromáticos e heterocíclicos e a γ -ciclodextrina os esteroides. Uma série de grupos funcionais são listados como potenciais ao processo de inclusão como: aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos orgânicos, ácidos gordos, aromáticos, gases e compostos polares de cadeia linear ou ramificada, tais como halogêneos, oxiácidos e aminas. Outra característica que chama bastante atenção é a capacidade da não formação de ligações covalentes ou a quebra de qualquer outra ligação entre o fármaco e a ciclodextrina, mantendo assim a integridade do composto ativo (VALLE, 2004; KURKOV e LOFTSSON, 2012)

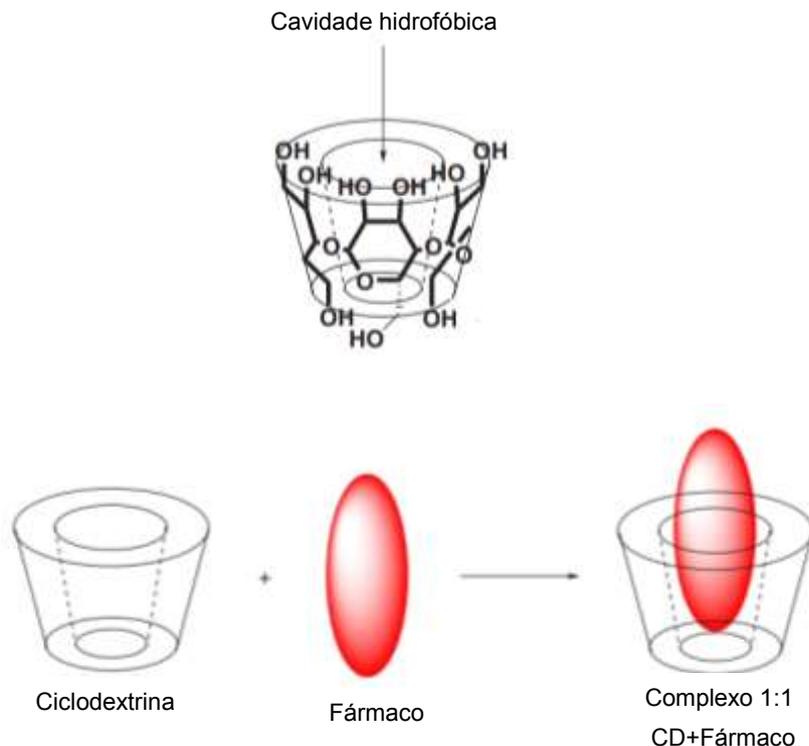


Figura 20- Estrutura funcional da ciclodextrina e formação do complexo de inclusão. Fonte: Ferreira et al. 2009. Adaptado.

Os complexos de inclusão em ciclodextrina podem ser formados por diversas técnicas que dependem das propriedades físico-químicas do composto ativo, cinética de equilíbrio, dosagem final desejada, entre outros fatores. Uma simples mistura a seco, mistura em soluções e suspensão e técnicas termomecânicas, são alguns dos métodos aplicados na reação de inclusão. A dissociação dos compostos à ciclodextrina ocorre de forma simples e fácil, graças à fraca força de ligações de Van der Waals, em que um aumento das moléculas de água no ambiente resulta na liberação do composto no meio (KURKOV e LOFTSSON, 2012; STELLA e HE, 2008).

Devido à versatilidade atribuída às moléculas de ciclodextrina e aos diversos benefícios conferidos como um excipiente, as aplicações da biotecnologia continuam sendo aplicadas visando melhorar ainda mais as propriedades dessa molécula. Tornando-a acessível quanto aos custos e obtenção, promovendo assim, a sua aplicação em larga escala nas diversas áreas das indústrias farmacêuticas.

2.5 Associação de fármacos: aplicações e finalidades.

A baixa taxa curativa resultante do tratamento monoterápico tem sido contornada pela combinação de fármacos. Esta medida vem sendo aplicada nos quadros infecciosos causados por vírus (HIV), bactérias como o *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e protozoários (*Plasmodium* spp.) e em quadros não infecciosos como o câncer. (TALLARIDA, 2001; MS, 2010; LUNA et al. 2010).

A combinação sinérgica de dois ou mais fármacos pode reduzir os efeitos tóxicos, ao contrário do que ocorre quando administrados de forma isolada em altas doses para atingir seus efeitos farmacológicos. Além disso, a associação reduz a exposição do fármaco aos alvos biológicos pela redução da sua concentração e ao rápido efeito, reduzindo ou eliminando a possibilidade de adquirirem resistência. Nesse sentido, a combinação de medicamentos tem sido aplicada para o tratamento de doenças complexas e que são reportadas pelos altos índices de resistência (LÉHAR, et al. 2009).

A interação dos fármacos por meio da combinação podem resultar em efeito sinérgico, antagônica ou aditiva. A classificação dessas interações pode ser

determinada através do “Índice de Combinação” (IC) introduzida em 1984 pelos cientistas Paul Talalay e Ting-Chao Chou. O teorema do IC pode ser calculado por meio do software CompuSyn. Quando o Índice de Combinação é menor que 1 ($IC < 1$) indica sinergismo, quando maior que 1 ($IC > 1$) indica antagonismo e quando igual a 1 ($IC = 1$) significa efeito aditivo (CHOU, 2010).

O isoblograma é um gráfico ilustrativo que também vem sendo amplamente utilizado para indicar os efeitos da interação entre os medicamentos. O gráfico consiste em uma curva da resposta farmacológica através da associação das drogas. As doses individuais de cada fármaco são inseridas nas coordenadas X e Y do gráfico que unidas formam uma reta que indica o efeito aditivo. Os pontos gerados abaixo desta reta indicam que as doses são sinérgicas, e os pontos acima indicam efeito antagônico (TALLARIDA, 2001).

O efeito sinérgico é definido pela interação de duas ou mais drogas, as quais são ativas contra um determinado patógeno e que resultam em uma maior eficácia pela ativação de diferentes mecanismos. A aditividade indica a soma da ação individual de cada droga, pelo fato de agirem em um mesmo receptor. O efeito antagônico ocorre o oposto, a combinação de um fármaco reduz a ação do segundo pela inibição do seu sítio de ligação (Golan et al. 2009).

A disponibilidade de um único fármaco para o tratamento da esquistossomose é um fator preocupante para o controle da doença. Visto que, nas áreas de alta endemicidade os elevados índices de reinfecções e a exposição excessiva e não controlada do PZQ aumenta a probabilidade do surgimento de cepas resistentes. Diante dos benefícios gerados pela associação de medicamentos, alguns estudiosos têm adotado essa metodologia para avaliar a atividade sinérgica de novas drogas ou das existentes combinadas ao PZQ. Araújo e colaboradores (2008) tem demonstrado resultados promissores nas investigações *in vitro* e *in vivo* através da associação do clonazepam (inibidor do sistema nervoso central), da lovastatina (inibidor da síntese do colesterol) com o PZQ. Outro estudo promissor tem sido realizado por Almeida e colaboradores (2015) ao avaliar o PZQ associado ao omeprazol frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Cepa LE) *in vitro*. Esses e outros achados encorajam a busca por novas estratégias quimioterápicas visando o controle da esquistossomose.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

- Avaliar a atividade esquistossomicida, *in vitro*, da β -lapachona em sua forma livre e complexada com a β -ciclodextrina isoladas e em associação com Praziquantel (PZQ) sobre *Schistosoma mansoni* (cepa BH).

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a atividade esquistossomicida da β -lapachona livre e no complexo de inclusão β -ciclodextrina e PZQ frente à esquistossômulos, vermes jovens e vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (cepa BH);

- Determinar as concentrações letais médias (CL_{50}) da β -lapachona livre e no complexo de inclusão β -ciclodextrina e PZQ;

- Avaliar a atividade esquistossomicida das associações na concentração equivalente a CL_{50} da β lap+PZQ e β CD- β lap+PZQ sobre esquistossômulos, vermes jovens e vermes adultos;

- Avaliar a atividade esquistossomicida da associação β lap+PZQ e β CD- β lap+PZQ em concentrações inferiores a CL_{50} sobre esquistossômulos, vermes jovens e vermes adultos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

Os experimentos foram iniciados após aprovação do processo de nº 23076.016190/2017-55 pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE.

Para o experimento foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem *Swiss Webster*, com 30 dias de idade, fornecidos e mantidos pelo Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), UFPE. Os animais foram alojados em gaiolas, sobre cama de maravalha previamente autoclavada, mantidos à temperatura ambiente de 25°C. Estes animais foram sujeitos a fotoperíodos de 12 horas de claro e 12 horas de escuro com livre acesso à ração (Labina®/Purina, São Paulo-SP) e água potável esterelizada *ad libitum*.

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

4.2 Compostos

Praziquantel(2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7-11β-hexahidro-4H pirazino(2,1a) isoquinolin-4-ona) foi adquirido da Sigma Aldrich Corporation (Lote 122K1443). β-lapachona (3,4-di-hidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona) (MM = 242,3g/mol) e β-lapachona complexada em ciclodextrina (2-O-Metil-β-ciclodextrina (MβCD; CRYSMEB[®], MM = 1190g/mol e DS = 0,5)) foram gentilmente cedidas pelo Laboratório de Fisiologia e Bioquímica dos Microrganismos do Departamento de Antibióticos-CB da UFPE e pelo Laboratório de Tecnologia dos Medicamentos (LTM) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE, respectivamente.

4.3 Infecção de Caramujos, Obtenção de Cercárias e Infecção de Camundongos com *Schistosoma mansoni* (cepa BH).

Fezes de camundongos infectados foram coletadas e tratadas de acordo com a técnica de sedimentação espontânea ou Hoffman. Em seguida, o sedimento foi exposto à iluminação e a temperatura de 28°C até que pudesse haver eclosão dos miracídios de *Schistosoma mansoni*. Os miracídios foram postos em contato com caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata*, permanecendo expostos à luz e ao calor por no mínimo 2 horas. Após a infecção, os moluscos foram postos em aquários e livres de exposição luminosa (STANDEN, 1952). Passados trinta dias, os moluscos infectados foram novamente expostos à luminosidade, para a eliminação das cercárias. Após 1 hora de exposição foi obtido a suspensão cercariana. Os camundongos previamente anestesiados com Xilasina e Ketamina foram infectados por via per cutânea com uma fração da suspensão cercariana contendo em média de 120 cercárias. Os animais permaneceram em contato com a suspensão por aproximadamente 30 minutos sob luminosidade para a penetração das cercárias. Recuperados do processo anestésico, os animais foram devolvidos para suas respectivas gaiolas.

4.4 Avaliação da susceptibilidade *in vitro* dos esquistossômulos com 3 horas frente a β -lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel.

Após 30 dias de infecção, os caramujos *Biomphalaria glabrata* foram expostos a luminosidade artificial por pelo menos 1 hora para obtenção das cercárias. A suspensão cercariana foi submetida a ação mecânica para transformação das cercárias em esquistossômulos, conforme Ramalho-Pinto (1974). Em seguida, os esquistossômulos foram lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20mM pH = 7,5, suplementado com penicilina (100UI/ml), estreptomicina (100 μ g/mL) e soro bovino fetal a 10% e transferidos para placas de 24 poços contendo o mesmo meio e incubados em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. A estimativa do número de esquistossômulo foi de 49 por poço.

Após 3 horas, a β -lapachona e a β CD- β -lapachona foram adicionadas aos poços nas concentrações que norteariam em 0.975-0.060 μ M e nas variações de 350-

100 μ M do PZQ. Em seguida, as placas foram novamente incubadas em estufa sob as mesmas condições.

4.5 Avaliação da susceptibilidade *in vitro* dos vermes jovens com 21 dias frente a β -lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel.

No 21^o dia de infecção os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Por meio da perfusão do sistema porta-hepático os vermes foram recuperados e lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20mM pH = 7,5 suplementado com penicilina (100UI/ml), estreptomicina (100 μ g/mL) e soro bovino fetal a 10%. Em seguida foram transferidos para placas de 24 poços em número de 38 vermes por poço contendo o mesmo meio e incubados em estufa a 37°C em atmosfera úmida 5% de CO₂.

Após o período de 2 horas de adaptação ao meio, a β -lapachona e β CD- β -lapachona foram adicionadas em concentrações de 22, 18, 14 e 10 μ M e concentrações que nortearam de 160-10 μ M do PZQ. As placas foram novamente incubadas em estufa sob as mesmas condições.

4.6 Avaliação da susceptibilidade *in vitro* dos vermes adultos com 50 dias frente a β -lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel.

No 50^o dia os camundongos infectados foram eutanasiados por deslocamento cervical. Por meio da perfusão do sistema porta-hepático e vasos mesentéricos inferiores os vermes foram recuperados e lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20mM pH = 7,5 suplementado com penicilina (100UI/ml), estreptomicina (100 μ g/mL) e soro bovino fetal a 10%. Em seguida, os vermes adultos machos e fêmeas foram transferidos para placas de 24 poços contendo o mesmo meio incubados em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Para o ensaio da β -lapachona livre e β CD- β -lapachona foram adicionados 8 vermes por poço e para o PZQ 12 vermes.

Após o período de 2 horas de adaptação ao meio, foram adicionados nas placas contendo os vermes machos a β -lapachona e β CD- β -lapachona em concentrações que variaram de 100-40 μ M e o praziquantel nas concentrações que variaram de 5-0.3125 μ M. Nas placas contendo vermes fêmeas foram adicionados a

β -lapachona e β CD- β -lapachona em concentrações que variaram de 15-2.5 μ M e o praziquantel em concentrações que variaram de 100-12.5 μ M. Em seguida, as placas foram novamente incubadas em estufa sob as mesmas condições. O monitoramento dos vermes foi estabelecido dentro do intervalo de 24 horas, sendo avaliados após 3, 6, 12 e 24 horas de exposição aos fármacos. Com auxílio do microscópio invertido, os parâmetros avaliados foram atividade motora, alterações de tegumento e taxa de mortalidade. Foram considerados mortos os vermes que não apresentaram nenhum movimento durante 2 minutos de observação. A motilidade foi classificada utilizando o sistema de pontuação em uma escala de 0-3. Sendo: 3, o movimento do corpo completo; 2, o movimento do corpo parcial; 1 corpo paralisado movendo apenas as extremidades; e 0, morto (MANNECK *et al.*2010).

Foram realizadas triplicatas para cada concentração utilizada. Meios de cultura contendo a β -ciclodextrina livre na concentração máxima avaliada, DMSO a 1,6% e meio livre foram utilizados como controles negativos.

4.7 Determinação da atividade esquistossomicida da associação β -lapachona/PZQ e β CD- β -lapachona/PZQ frente às diferentes fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (Cepa BH).

Inicialmente foram determinadas as CL₅₀ (concentração letal 50%) da β -lapachona, da β CD- β -lapachona e do PZQ frente às fases evolutivas esquistossômulos (3h), vermes jovens (21 dias) e vermes adultos machos e fêmeas (50 dias) de *Schistosoma mansoni* (cepa BH), quando incubadas por um período de 24 horas.

As atividades esquistossomicida da associação β -lapachona/PZQ e β CD- β -lapachona/PZQ frente as diferentes fases evolutivas do *S. mansoni* foram determinadas utilizando concentrações que variaram da CL₅₀ a 0,0625CL₅₀ da β -lapachona e β CD- β -lapachona e da CL₅₀ a 0,125CL₅₀ do PZQ. A β -lapachona/PZQ e a β CD- β -lapachona/PZQ foram simultaneamente adicionadas as placas. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

4.8 Critério de avaliação

O monitoramento dos vermes foi estabelecido dentro do intervalo de 24 horas, sendo avaliados após 3, 6, 12 e 24 horas de exposição aos fármacos. Com auxílio do microscópio invertido, os parâmetros avaliados foram atividade motora, alterações de tegumento e taxa de mortalidade. Foram considerados mortos os vermes que não apresentaram nenhum movimento durante 2 minutos de observação (MANNECK *et al.* 2010). A motilidade foi classificada utilizando o sistema de pontuação em uma escala de 0-3. Sendo: 3, o movimento do corpo completo; 2, o movimento do corpo parcial; 1 corpo paralisado movendo apenas as extremidades; e 0, morto.

Foram realizadas duplicatas para cada concentração utilizada. Os poços contendo a β -ciclodextrina livre, DMSO a 1,6% e apenas meio RPMI-1640 foram utilizados como controles negativos.

As CL_{50} foram calculadas usando o GraphPad Prism[®] software versão 5.0.

O índice de combinação (IC) e as representações gráficas foram realizadas usando o software CompuSyn. Uma ação sinérgica entre as drogas será definida quando o valor de IC for menor que 1, efeito aditivo quando IC for igual a 1 e efeito antagônico quando o valor de IC for maior que 1 (CHOU, 2006).

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da susceptibilidade *in vitro* de esquistossômulos com 3 horas frente a β -lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel.

Durante o intervalo de 24 horas os esquistossômulos incubados sem β -lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel, controles negativos, permaneceram com movimentos peristálticos normais e ocasionalmente aderidos ao fundo da placa através das ventosas e sem alterações tegumentares (score=3).

A susceptibilidade, *in vitro*, de esquistossômulos com 3 horas, no intervalo de 24 horas após incubação com a β -lapachona está descrita em score de motilidade na tabela 3.

Tabela 3-Score de motilidade, expresso em percentagem, de esquistossômulos com 3 horas controles e tratados com β -lapachona em 24h de incubação.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo β -lap (n=49)	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
0.975 μ M	73.47	20.41	6.12		18.37	24.49	26.54	30.61		30.61	14.29	55.1				100
0.487 μ M	100				28.57	42.86	28.57			51	28.6	20.4		10.2	18.37	71.43
0.243 μ M	100				40.82	59.18				79.6	12.2	8.2		34.69	10.2	55.1
0.121 μ M	100				100					100					48.98	20.41
0.060 μ M	100				100					100				83.67	14.29	2.04

(3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) imóvel, mas vivos; (0) Morto.

O efeito da β -lapachona sobre esquistossômulos com 3 horas mostrou uma relação tempo/concentração dependentes. As alterações tegumentares e de motilidade começaram a ser percebidas no intervalo de 3 horas de incubação com a concentração de 0,975 μ M. Com esta mesma concentração o efeito esquistossomicida foi observado a partir de 6 horas com 30,61 % de vermes mortos e alcançou o efeito máximo ao final do intervalo de 24 horas. Neste intervalo de

tempo a taxa de mortalidade variou de 2,04% com a concentração de 0,060 μM a 100% com a concentração de 0,975 μM .

A motilidade de esquistossômulos incubados com $\beta\text{CD-}\beta\text{-Lapachona}$ é mostrada na tabela 4.

Tabela 4-Score de motilidade, expresso em percentagem, de esquistossômulos com 3 horas controles e tratados com $\beta\text{CD-}\beta\text{-lap}$ em 24h de incubação.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo $\beta\text{CD-}\beta\text{-lap}$ (n=49)	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle $\beta\text{-CD}$	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
0.975 μM	57.2	38.8	4		6.1	49	8.2	36.7	44.9	4.1	51					100
0.487 μM	61.2	32.7	6.1		20.4	49	18.3	12.3	36.7	22.5	40.8					2.04
0.243 μM																
0.121 μM	63.3	36.7				59.2	36.7	4.1	61.2	20.4	18.4			18.37	8.16	
0.060 μM	100				100				100					44.9	16.33	
	38.77															
	100				100				100					73.47	24.49	2.04

(3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) imóvel, mas vivos; (0) Morto.

Redução de peristaltismo e da motilidade dos esquistossômulos, bem como a formação de bolhas foram percebidas logo no primeiro intervalo de observação. Esse efeito aumentou de acordo com a concentração de $\beta\text{CD-}\beta\text{-Lapachona}$ e com o tempo de incubação. A atividade esquistossomicida da $\beta\text{CD-}\beta\text{-Lapachona}$ teve início com 6 horas de incubação. Neste intervalo, pudemos registrar taxas de mortalidade de 36,7%, 12,3% e 4,1% para as concentrações de 0.975 μM , 0.487 μM e 0.243 μM , respectivamente. Ao final de 24 horas após incubação, nítidos danos tegumentares foram observados e o efeito esquistossomicida alcançou 100% dos vermes na concentração de 0.975 μM e 97.96%, 73.47%, 38.77% e 2.04% nas concentrações de 0.487, 0.243, 0.121 e 0.060 μM , respectivamente.

A tabela 5 mostra as alterações de motilidade dos esquistossômulos frente ao PZQ. O efeito do PZQ em contrair a musculatura longitudinal do verme pôde ser observado imediatamente e permaneceu durante todo o período de incubação. Nos

intervalos de 3, 6 e 12 horas, em todas as concentrações, os esquistossômulos permaneceram contraídos sendo observada apenas a movimentação das ventosas. Ao final do período de incubação, 24 horas, pôde-se observar a formação de bolhas no tegumento e mortalidade em todas as concentrações variando de 85,71-61,22%.

Tabela 5-Score de motilidade, expresso em percentagem, de esquistossômulos com 3 horas controles e tratados com PZQ em 24h de incubação.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo PZQ (n=49)	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
350µM			100				100					100			14.29	85.71
300µM		100					100					100			18.37	81.63
250µM		100					100					100			22.45	77.55
200µM		100					100					100			22.45	77.55
150µM		100					100					100			24.49	75.51
100µM		100					100					100			38.78	61.22

(3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) imóvel, mas vivos; (0) Morto.

5.2 Avaliação da susceptibilidade *in vitro* dos vermes jovens com 21 dias frente a β -lapachona livre, β CD- β -lapachona e praziquantel.

Durante o intervalo de 24 horas os vermes jovens incubados sem os fármacos permaneceram com movimentos peristálticos normais e ocasionalmente aderidos ao fundo da placa através das ventosas e sem alterações tegumentares (score=3).

Na tabela 6 foram observados que os efeitos da β -lapachona frente aos vermes jovens foram mais evidentes após 12 h de incubação, além das alterações de motilidade e de tegumento, também foi observado mortalidade dos vermes com taxas de 36,85% e 31,58% nas concentrações de 22 μ M e 18 μ M, respectivamente.

No último intervalo de observação, 24 horas, os danos tegumentares foram evidenciados através da presença de bolhas, também foi notado redução ou ausência de peristaltismo, de movimentação das ventosas e de motilidade. As taxas

de mortalidade variaram em 97,37%, 57,89% e 39,47% nas concentrações de 22 μM , 18 μM e 14 μM , respectivamente.

Tabela 6- Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes jovens com 21 dias controles e tratados com β -lapachona em 24h de incubação.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo β -Lap (n=38)	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
22 μM	100				76.32	13.16	7.89	2.63	52.63	13.16		36.84			2.63	97.37
18 μM	100				100				60.53	7.89		31.58				42.11
14 μM	100				100										60.53	39.47
10 μM	100				100				100					50	50	

(3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) imóvel, mas vivos; (0) Morto.

A tabela 7 mostra as avaliações da βCD - β -lapachona frente aos vermes jovens. Os grupos controles negativos permaneceram normais (score=3) durante o período de observação de 24 horas.

Tal como ocorreu com os vermes incubados com β -lapachona, aqueles incubados com βCD - β -lapachona manifestaram efeitos mais evidentes após 12 h de incubação. As alterações tegumentares com aparecimento de bolhas foram observadas em todas as concentrações, além de ausência ou redução de contrações peristálticas ao longo do corpo do verme e ausência de contração das ventosas. Essas alterações tornaram-se mais evidentes no intervalo de 24 horas. Nesse período as taxas de mortalidade foram de 100%, 36,84% e 34,21%, nas concentrações de 22 μM , 18 μM e 14 μM , respectivamente. O valor da CL_{50} foi determinado em 17,2 μM para βCD - β -lapachona.

Tabela 7-Score de motilidade, expresso em porcentagem, de vermes jovens com 21 dias controles e tratados com β CD- β -lapachona em 24h de incubação.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo β CD- β -Lap (n=38)	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle β -CD	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
22 μ M	100				34.21	42.10	15.8	7.89	23.68		34.21	42.11				100
18 μ M	100				97.37			2.63	57.89		5.26	36.84				63.15
14 μ M	100															
10 μ M	100				100				89.47		10.53				65.79	34.21
	100				100					100				60.52	39.48	

(3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) imóvel, mas vivos; (0) Morto.

Quando vermes jovens foram incubados com PZQ se observou imediato efeito sobre a motilidade com redução das contrações peristálticas e de ventosas. Também, progressivo encurtamento do corpo do verme por contração da musculatura longitudinal foi observado. Passadas 3 horas de incubação esses efeitos estavam nitidamente perceptíveis e permaneceram durante todo o período de observação (score=1). Em 24 horas de incubação, além dessas alterações foi registrado morte em 60% e 30% dos vermes nas concentrações de 160 e 80 μ M, respectivamente, e em 5% deles nas concentrações de 40 e 20 μ M.

Tabela 8-Score de motilidade, expresso em percentagem de vermes jovens com 21 dias, controles e tratados com PZQ em 24h de incubação.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo PZQ (n=38)	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
160µM			100				100					100			40	60
80µM			100				100					100			70	30
40µM			100				100					100			95	5
20µM			100				100					100			95	5
10µM			100				100					100			100	

(3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) imóvel, mas vivos; (0) Morto.

5.3 Avaliação da susceptibilidade *in vitro* dos vermes adultos machos com 50 dias frente a β -lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel.

Durante o intervalo de 24 horas os vermes adultos machos incubados sem β -lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel, controles negativos, permaneceram com movimentos peristálticos normais e ocasionalmente aderidos ao fundo da placa através das ventosas e sem alterações tegumentares (score=3). A tabela 9 mostra a análise dos vermes adultos machos frente à β -lapachona durante o intervalo de 24 horas de incubação.

A atividade da β -lapachona sobre os vermes adultos machos pôde ser evidenciada no intervalo de 6 horas quando foi observada uma redução da motilidade dos vermes em 12,5 % quando incubados com 100 µM. Passadas 12 horas as alterações de motilidade e do tegumento tornaram-se mais evidentes e levaram a morte 12,5 % dos vermes nessa mesma concentração. As alterações de motilidade foram percebidas também nas concentrações de 80 e 60µM. No período final de 24 horas houve aumento nos danos tegumentares e nas alterações de motilidade, sendo registrado taxas de mortalidade de 75%, 62,5% e 12,5%, nas concentrações de 100, 80 e 60µM, respectivamente.

Tabela 9- Score de motilidade, expresso em porcentagem de vermes adultos machos com 50 dias controles e tratados com β -lapachona livre em 24h de incubação.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo β-Lap (n=8)	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
100 μ M	100				87.5	12.5			37.5	50	12.5			25	75	
80 μ M	100				100				62.5	37.5				37.5	62.5	
60 μ M	100				100				12.5	87.5				50	37.5	
40 μ M	100				100				100					87.5	12.5	

(3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) imóvel, mas vivos; (0) Morto.

Na tabela 10, a ação da β CD- β -lapachona também teve início no intervalo de 6 horas sendo observado as alterações de motilidade e peristaltismo nas concentrações de 100 μ M e 80 μ M (score=2). Após 12 horas de incubação, as alterações de motilidade foram observadas em todas as concentrações e em duas delas, 100 μ M e 80 μ M, foi observado taxa de mortalidade de 37,5% e 12,5%, respectivamente. Ao final de 24 horas, os danos aos vermes mostraram-se mais evidentes nas concentrações de 100 μ M e 80 μ M com formação de bolhas sobre o tegumento, ausência de peristaltismo e ausência e/ou redução de motilidade. As taxas de mortalidade nesse intervalo foram de 100%, 87,5% e 50% nas concentrações de 100, 80 e 60 μ M, respectivamente.

Tabela 10- Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes adultos machos com 50 dias controles e tratados com β CD- β -lapachonaem 24h de incubação.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo βCD-β-Lap (n=8)	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle β -CD	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
100 μ M	100				100				25	37.5	37.5					100
80 μ M	100				100					87.5	12.5				12.5	87.5
60 μ M	100				100				50	50					50	50
40 μ M	100				100				50	50				87.5	12.5	

(3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) imóvel, mas vivos; (0) Morto.

Os efeitos do PZQ (tabela 11) observados sobre vermes adultos machos foram semelhantes àqueles observados em esquistossômulos e vermes jovens. A contração da musculatura longitudinal do verme ocorreu logo após o contato com o PZQ deixando os vermes encurtados e curvos. Após 3 horas de incubação a motilidade atingiu o score 1. Os danos tegumentares, como a formação de bolhas e rompimento da integridade da membrana, puderam ser vistos após 6 horas tornando-se mais evidentes com o aumento do tempo de incubação. Nesse mesmo intervalo também foi possível observar mortalidade de vermes nas concentrações de 5 μ M e 2,5 μ M com taxas de 66,67% e 25%, respectivamente. As taxas de mortalidade ao final do período de incubação atingiram 75%, 58,33%, 16,67% e 8,33%, nas concentrações de 5 μ M, 2,5 μ M, 1,25 μ M e 0.625 μ M, respectivamente.

Tabela 11- Score de motilidade, expresso em porcentagem, de vermes adultos machos com 50 dias controles e tratados com PZQem 24h de incubação.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo PZQ (n=12)	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
5µM			100			33.33	66.67			33.33	66.67			25	75	
2.5µM		58.33	100			75	25			66.67	33.33				41.67	
1.25µM			100			100				100					83.33	
0.625µM		16.67														
0.3125µM			100			100				100				91.67	8.33	
			100			100				100				100		

(3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) imóvel, mas vivos; (0) Morto.

5.4 Avaliação da susceptibilidade *in vitro* dos vermes adultos fêmeas com 50 dias frente a β -lapachona, β CD- β -lapachona e praziquantel.

Todos os controles negativos permaneceram normais (score=3) durante todo processo de avaliação da susceptibilidade *in vitro* dos vermes adultos fêmeas frente a β -lapachona livre, β CD- β -lapachona e praziquantel.

Na tabela 12 podemos observar que os efeitos da β -lapachona frente aos vermes adultos fêmeas foram evidenciados após 6 horas de incubação. Em todas as concentrações foi possível observar alteração da motilidade dos vermes sendo esse efeito mais evidente nas concentrações de 15µM e 10µM. No intervalo de 12 horas, os danos tegumentares tornaram-se evidentes na concentração de 15µM através da formação de bolhas, ainda nessa concentração foi registrada taxa de mortalidade de 58,33%. As lesões tegumentares e alterações na motilidade de vermes progrediram de acordo com o tempo e concentração levando a taxas de mortalidade de 100%, 83,33% e 25% nas concentrações de 15µM, 10µM, e 5µM, respectivamente ao final do período de incubação.

Tabela 12- Score de motilidade, expresso em porcentagem, de vermes adultos fêmeas com 50 dias controles e tratados com β -lapachona livre em 24h de incubação.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo β-Lap (n=12)	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
15 μ M	100					66.67	33.33			41.67	58.33					100
10 μ M	100				16.67	66.67	16.67			25	66.67	8.33			16.67	83.33
5 μ M	100				75	25			41.67	50	8.33		16.67	58.33		25
2.5 μ M	100				91.67	8.33			91.67	8.33			25	75		

(3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) imóvel, mas vivos; (0) Morto.

Na tabela 13 observa-se que as alterações na motilidade dos vermes frente a β CD- β -lapachona ocorreram nas primeiras horas de incubação levando a morte 16,67% dos vermes após 6 horas de incubação na concentração de 15 μ M.

Tabela 13- Score de motilidade, expresso em porcentagem, de vermes adultos fêmeas de *S. mansoni* controles e tratados com β CD- β -lapachona em 24h de incubação.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo βCD-β-Lap (n=12)	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle β -CD	100				100				100				100			
Controle Meio	100				100				100				100			
15 μ M	83.33	16.67				25	58.33	16.67		33.33	66.67					100
10 μ M	100				25	75			16.67	16.67	66.67				8.33	91.67
5 μ M	100				75	25			33.33	66.67				50	25	25
2.5 μ M	100				83.33	16.67			83.33	16.67			8.33	41.67	50	

(3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) imóvel, mas vivos; (0) Morto.

As alterações de tegumento e de motilidade também ocorreram em função do tempo de incubação e da concentração da β CD- β -lapachona levando a taxas de mortalidade de 100%, 91,67% e 25% nas concentrações de 15, 10, e 5 μ M, respectivamente ao final do período de incubação de mortalidade nas concentrações de 15, 10 e 5 μ M, respectivamente.

A susceptibilidade de vermes adultos fêmeas ao PZQ foi menor do que a de vermes adultos machos. Concentrações maiores foram necessárias para causar a morte de vermes adultos fêmeas, mas os efeitos do PZQ foram semelhantes em ambos os vermes. Logo após o contato com o PZQ os vermes tiveram o corpo encurtados e alguns ganharam a forma em espiral. A motilidade atingiu o score 1 após 3 horas de incubação e a morte de 12,5% dos vermes foi observada a partir do intervalo de 6 horas de incubação com a concentração de 100 μ M. Após 24 horas, as alterações no tegumento tornaram-se mais evidentes e a mortalidade dos vermes alcançou taxas de 50% e 37,5% nas concentrações de 100 μ M e 75 μ M e de 25% nas concentrações de 50 μ M e 25 μ M (tabela 14).

Tabela 14- Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes adultos fêmeas com 50 dias controles e tratados com Praziquantel em 24h de incubação.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)															
Grupo PZQ (n=8)	3 h			6h				12h				24h			
	3	2	1	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle DMSO	100			100				100				100			
Controle Meio	100			100				100				100			
100 μ M		100			87.5	12.5			87.5	12.5			50	50	
75 μ M		25	75			100				100					62.5
50 μ M		37.5													
25 μ M		75	25			100				100				75	25
12.5 μ M		87.5	12.5			100				100				75	25
		100				100				100				100	

3) Movimento do corpo completo; (2) Movimento do corpo parcial; (1) imóvel, mas vivos; (0) Morto.

5.5 Ensaio de compostos isolados contra as formas evolutivas de *S. mansoni* (cepa BH).

As concentrações de β Lapachona, β -ciclodextrina- β -lapachona e praziquantel que causaram a morte dos vermes em 50% foram determinadas frente as três fases evolutivas do *Schistosoma mansoni* (cepa BH): esquistossômulo, vermes jovens e vermes adultos machos e fêmeas. Os resultados encontram-se na tabela 15. Baseado na CL_{50} , a β -Lapachona e β CD- β -Lapachona tiveram atividade, consideravelmente, muito maior que o praziquantel contra esquistossômulos. Reduzindo a motilidade e causando morte em concentrações inferiores a 1 μ M, enquanto o PZQ requereu uma concentração maior que 150 μ M. Esse perfil de atividade da β -Lapachona e da β CD- β -Lapachona também ocorreu frente a vermes jovens e vermes adultos fêmeas. Em vermes adultos machos de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) as CL_{50} da β -Lapachona e da β CD- β -Lapachona foram aproximadamente 30 vezes maiores que a CL_{50} do Praziquantel. Os valores das CL_{50} foram posteriormente usados para a avaliação dos efeitos das combinações β -Lapachona-PZQ e β CD- β -Lapachona-PZQ.

Tabela 15- Efeito esquistossomicida de β -lapachona, β CD- β -lapachona e Praziquantel sobre as formas evolutivas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) após 24h. Valores representam a concentração letal encontrada para 50% dos vermes CL_{50} [μ M].

CL_{50} [μ M]	Esquistossômulos	Vermes jovens (21 dias)	Verme adulto macho	Verme adulto fêmea
β -lapachona	0,23	15,6	69	6,6
β CD- β -lapachona	0,15	17,2	60	6,2
PZQ	164,9	78,9	1,8	36,4

5.6 Efeito da combinação β -Lapachona-PZQ contra esquistossômulos, vermes jovens e vermes adultos machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH).

O efeito da associação da β -Lapachona com o PZQ mostrou ser mais eficaz sobre vermes jovens (Tabela 16). Os menores índices de combinação (IC) foram alcançados com as razões de combinação de $0,5CL_{50}$ de β -Lapachona+ $0,125CL_{50}$

de PZQ com IC igual a 0,42 e 0,25CL₅₀ de β-Lapachona+0,125CL₅₀ de PZQ com IC de 0,34, nessas associações a CL₅₀ de PZQ foi reduzida em 87,5%. Todavia, quando esquistossômulos foram submetidos a essa mesma associação não foi possível estabelecer um nível de correlação entre efeito concentração, uma vez que durante o ensaio foi registrado 100% de mortalidade entre todos os esquistossômulos em todas as combinações estabelecidas. Vale ressaltar que a associação dos dois compostos causou importantes danos no tegumento dos esquistossômulos. A figura 21 mostra o gráfico da fração afetada e índice de combinação relacionada as distribuições sinérgicas e antagônicas. Os pontos marcados acima da linha do índice de combinação (CI, sigla em inglês) indica antagonismo (CI>1) e abaixo sinergismo (CI<1).

Tabela 16- Efeito da β-lapachona com praziquantel sobre vermes jovens de *S. mansoni* (cepa BH) com 21 dias após 24 horas.

Vermes Jovens					
Razão Testada		β-lap +PZQ* (Vermes Mortos)	IC***	Redução da LC ₅₀ (%)	
β-lap	PZQ			β-lap	PZQ
0,5CL ₅₀	0,125CL ₅₀	7,8 +9,86 (62,5%)**	0,42	50%	87,5%
0,5CL ₅₀	0,25CL ₅₀	7,8 +19,72 (65%)	0,65	50%	75%
0,25CL ₅₀	0,125CL ₅₀	3,9 + 9,86 (57,5%)	0,34	75%	87,5%
0,25CL ₅₀	0,25CL ₅₀	3,9 +19,72 (65%)	0,56	75%	75%
0,25CL ₅₀	0,5CL ₅₀	3,9 + 39,45 (67,5%)	1,02	75%	50%

*Valores de concentração expressos em μM.

**Porcentagem de vermes mortos (n=40) avaliados.

***Valor de índice de combinação menor que 1 indica sinergismo.

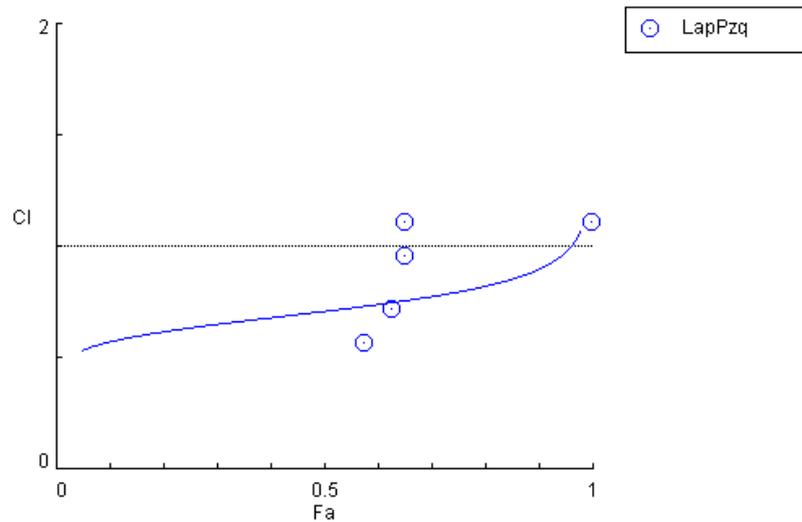


Figura 21- Gráfico da relação do Índice de Combinação e Fração afetada (Fa-IC) para vermes jovens β -Lapachona-PZQ.

A tabela 17 mostra o efeito da associação da β -Lapachona com o PZQ contra vermes adultos de *S. mansoni* (cepa BH). O sinergismo entre os dois compostos foi observado na associação entre $0,25CL_{50}$ de β -Lapachona e $0,5CL_{50}$ de PZQ com redução de 75% e 50% do valor inicial das CL_{50} , respectivamente. O gráfico da fração afetada/índice de combinação mostra o único ponto sinérgico abaixo do CI (figura 22).

Tabela 17- Efeito da β -lapachona com Praziquantel sobre vermes adultos machos de *S. mansoni* (cepa BH) com 50 dias após 24 horas.

Vermes Adulto Macho					
Razão Testada		β -lap +PZQ* (Vermes Mortos)	IC***	Redução da LC_{50} (%)	
β -lap	PZQ			β -lap	PZQ
$0,5CL_{50}$	$0,25CL_{50}$	34,5+0,45 (100%)**	1,6		
$0,25CL_{50}$	$0,5CL_{50}$	17,25+0,90 (100%)	0,8	75%	50%
$0,125CL_{50}$	$0,25CL_{50}$	8,62+0,45 (83,33%)	1,9		
$0,062CL_{50}$	$0,5CL_{50}$	4,31+0,90 (66,67%)	1,5		

*Valores de concentração expressos em μ M.

**Percentagem de vermes mortos (n=6) avaliados.

***Valor de índice de combinação menor que 1 indica sinergismo.

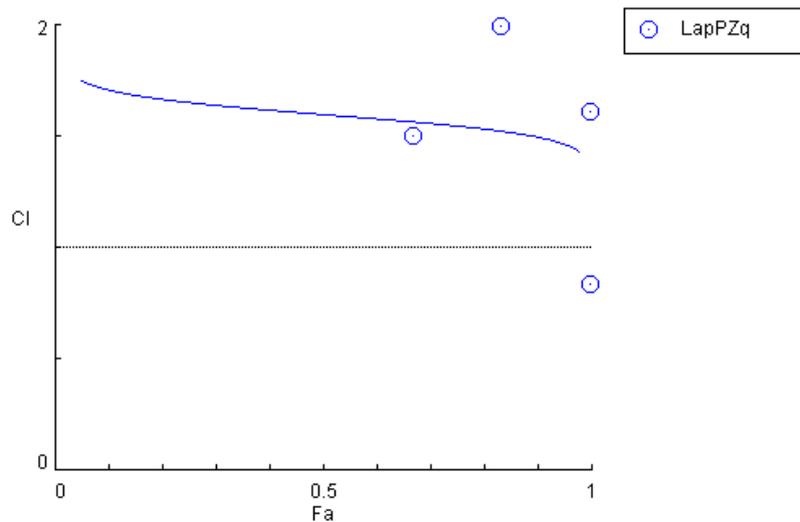


Figura 22- Gráfico da relação do Índice de Combinação e Fração afetada (Fa-IC) para verme adulto macho β -Lapachona-PZQ.

Quando essa mesma razão da associação atuou contra vermes adultos fêmeas quatro combinações mostraram sinergismo (Tabela 18) (Figura23). Em três delas foram utilizadas a própria CL_{50} da β -lapachona e concentrações inferiores a CL_{50} do PZQ, o qual foi reduzido a valores iguais ou superiores a 50%.

Tabela 18- Efeito da β -lapachona e praziquantel sobre vermes adultos fêmeas de *S. mansoni* (cepa BH) com 50 dias após 24 horas.

Verme Adulto Fêmea					
Razão Testada		β -lap +PZQ* (Vermes Mortos)	IC***	Redução da LC_{50} (%)	
β -lap	PZQ			β -lap	PZQ
$0,5CL_{50}$	$0,25CL_{50}$	3,3+9,1 (80%)**	0,81	50%	75%
CL_{50}	$0,125CL_{50}$	6,6+4,55 (80%)	0,75	0%	87,5%
CL_{50}	$0,25CL_{50}$	6,6+9,1 (100%)	0,51	0%	75%
CL_{50}	$0,5CL_{50}$	6,6+18,2 (100%)	0,80	0%	50%

*Valores de concentração expressos em μ M.

**Percentagem de vermes mortos (n= investigados).

***Valor de índice de combinação menor que 1 indica sinergismo.

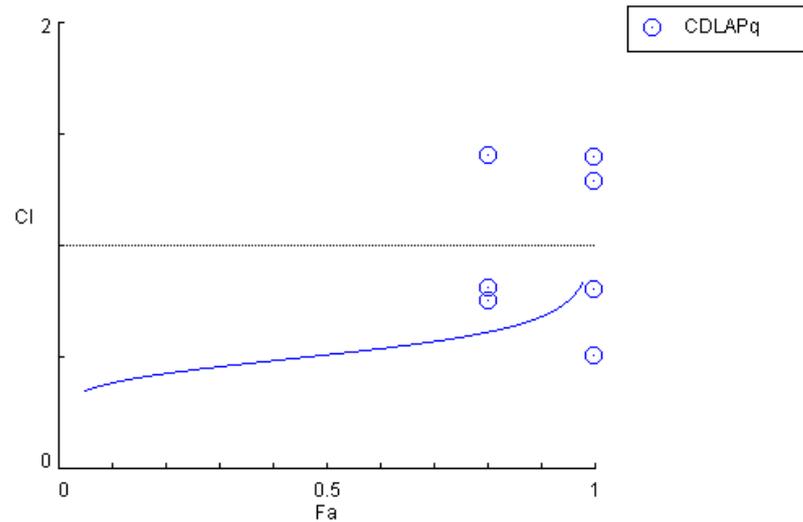


Figura 23- Gráfico da relação do Índice de Combinação e Fração afetada (Fa-IC) para verme adulto fêmea β -Lapachona-PZQ.

5.7 Efeito da combinação β CD- β -Lapachona-PZQ contra esquistossômulos, vermes jovens e vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni* (cepa BH).

A associação β CD- β -Lapachona com PZQ também mostrou sinergismo em três combinações frente a vermes jovens (Tabela 19). O menor IC foi registrado na associação 0,5CL₅₀ de β CD- β -Lapachona e 0,125CL₅₀ de PZQ com percentuais de redução da CL₅₀ de 50% e 87,5%, respectivamente. A figura 24 ilustra os pontos sinérgicos (pontos abaixo do CI) observados na associação β CD- β -Lapachona-PZQ.

Tabela 19- Efeito da associação β CD- β -Lapachona e Praziquantel sobre vermes jovens de *S. mansoni* (cepa BH) com 21 dias após 24 horas.

Verme Jovens					
Razão Testada		β -CD- β -lap +PZQ* (Vermes Mortos)	IC***	Redução da LC ₅₀ (%)	
β CD- β -lap	PZQ			β CD- β -lap	PZQ
0,5CL ₅₀	0,125CL ₅₀	8,6+9,86 (75%)**	0,74	50%	87,5%
0,25CL ₅₀	0,125CL ₅₀	4,3+9,86 (60%)	0,60	75%	87,5%
0,25CL ₅₀	0,25CL ₅₀	4,3+19,72 (72,5%)	0,97	75%	75%

*Valores de concentração expressos em μ M.

**Percentagem de vermes mortos (n=40) avaliados.

***Valor de índice de combinação menor que 1 indica sinergismo.

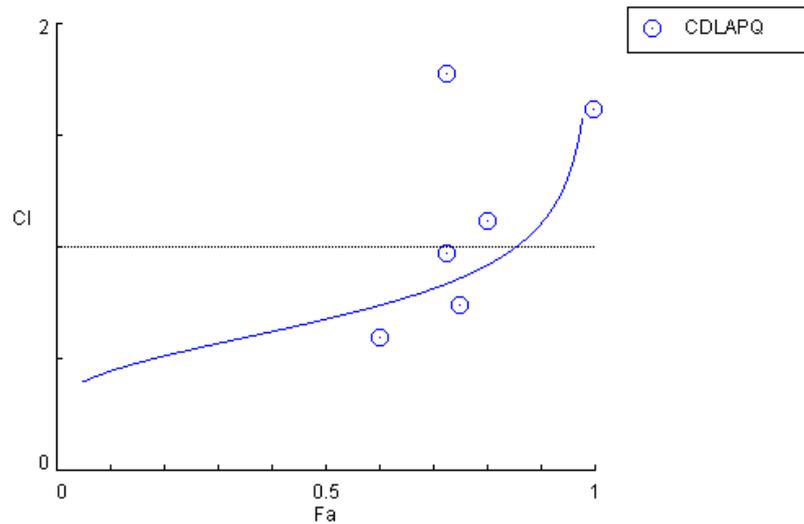


Figura 24- Gráfico da relação do Índice de Combinação e Fração afetada (Fa-IC) para vermes jovens β CD- β -Lapachona-PZQ.

A tabela 20 mostra o efeito da associação da β CD- β -Lapachona com o PZQ contra vermes adultos machos de *S. mansoni* (cepa BH). O sinergismo entre os dois compostos foi observado em seis associações mostrando que a β CD- β -Lapachona foi mais eficaz que a β -Lapachona livre sobre vermes adultos machos. O percentual de redução da CL_{50} alcançou taxas de 93,75% e 87,5% na combinação de $0,0625CL_{50}$ e $0,125CL_{50}$ da β CD- β -Lapachona com $0,5CL_{50}$ de PZQ, nessas combinações foram registrados os menores IC, 0,31 e 0,4, respectivamente. O PZQ também apresentou elevado percentual de redução da LC_{50} quando $0,125CL_{50}$ foi associado a $0,5CL_{50}$ de β CD- β -Lapachona. Quando essa mesma razão da associação atuou contra vermes adultos fêmeas nenhum efeito sinérgico foi observado. O gráfico da fração afeta e índice de combinação ilustra os pontos sinérgicos obtidos da associação β CD- β -Lapachona-PZQ frente aos vermes adultos machos (figura 25).

Tabela 20- Efeito da associação β CD- β -Lapachona e Praziquantel sobre vermes adultos machos de *S. mansoni* (50 dias) após 24 horas.

Verme Adulto Macho					
Razão Testada		β -CD- β -lap +PZQ* (Vermes Mortos)	IC***	Redução da LC ₅₀ (%)	
β CD- β -lap	PZQ			β CD- β -lap	PZQ
CL ₅₀	0,125CL ₅₀	60+0,22 (100%)**	0,91	0%	87,77%
0,5CL ₅₀	0,125CL ₅₀	30+0,22 (100%)	0,46	50%	87,77%
0,5CL ₅₀	0,25CL ₅₀	30+0,45 (100%)	0,46	50%	75%
0,25CL ₅₀	0,5CL ₅₀	15+0,90 (83,33%)	0,63	75%	50%
0,125CL ₅₀	0,5CL ₅₀	7,5+0,90 (66,67%)	0,41	87,5%	50%
0,0625CL ₅₀	0,5CL ₅₀	3,75+0,90 (33,33%)	0,31	93,75%	50%

*Valores de concentração expressos em μ M.

**Porcentagem de vermes mortos (n=6) avaliados.

***Valor de índice de combinação menor que 1 indica sinergismo.

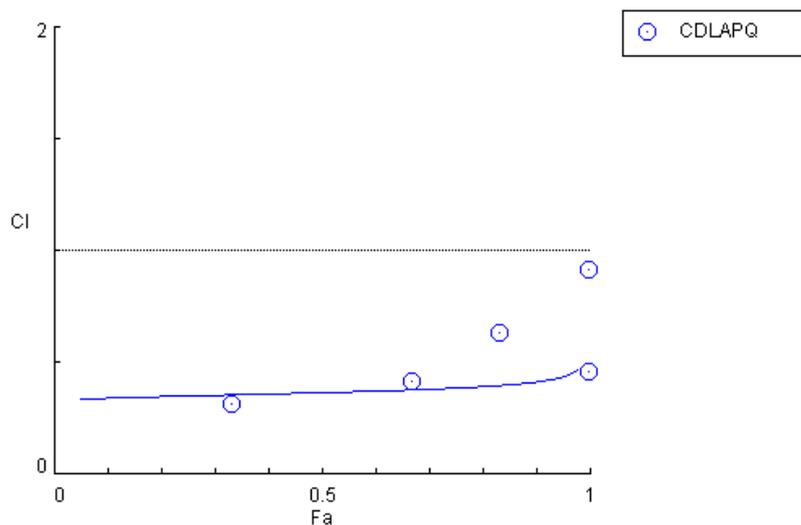


Figura 25- Gráfico da relação do Índice de Combinação e Fração afetada (Fa-IC) para verme adulto macho β CD- β -Lapachona-PZQ.

6 DISCUSSÃO

A esquistossomose, embora seja uma doença antiga, ainda apresenta caminho bastante limitado para o tratamento. Os esforços e o incentivo para pesquisa de novos fármacos e alternativas terapêuticas estão presentes de forma bem discreta. Essa resistência ao engajamento nos investimentos de pesquisas, principalmente pelas grandes indústrias farmacêuticas, existe pelo fato da esquistossomose atingir, em grande parte, comunidades pobres e desprovidas da assistência sanitária. Em que o retorno financeiro às grandes empresas não atingiria o patamar esperado (KATZ, 2008; BERGQUIST et al. 2017).

Atualmente a única forma para o tratamento e controle da esquistossomose é utilização do praziquantel (PZQ). A administração do PZQ tem se mostrado seguro e eficaz frente a todas as espécies de *Schistosoma* spp. durante os últimos 40 anos desde sua descoberta. Isso tornou de certa forma, a busca por novos agentes antischistosoma estacionária por um longo período. Entretanto, os relatos de resistência induzida em laboratório e de casos isolados registrados em comunidades no continente africano tem sido a causa da preocupação e objetivo para a busca de alternativas no tratamento da esquistossomose (BOTROS et al. 2005; MELMAN et al. 2009; COUTO et al. 2011).

Com os avanços da química medicinal uma serie de moléculas naturais, semissintéticas e sintéticas tem sido amplamente investigada para combater as espécies de *Schistosoma*. Exemplos dessas moléculas estão o fitol, hesperidina, epiisopiloturine, curcumin e o 1,3-benzodioxois. Fármacos que já são utilizados destinado para outros alvos biológicos também vem sendo explorados, como o mefloquine e o trioxaquines, os quais são eficazes contra a malária e tem mostrado resultados promissores frente ao *Schistosoma* (LAGO et al. 2017)

Uma das limitações encontrada no tratamento pelo praziquantel é a sua baixa eficácia contra as fases jovens das espécies de *Schistosoma* (KAMEL e BAYAUMY, 2017). Isso permite que os vermes atinjam a sua maturidade sexual e se acasalem, dando início ao processo de oviposição resultando assim na reação inflamatória, a qual é responsável pela alta razão da morbidade e mortalidade da esquistossomose.

Pudemos confirmar no presente trabalho, *in vitro*, a baixa eficácia do PZQ frente as fases jovens quando comparada aos vermes adultos. Os esquistossômulos com 3 horas nas concentrações de 350 μ M e 100 μ M resultou na mortalidade de

85,71% e 61,22%, respectivamente no período de 24 horas. Neste mesmo intervalo, o PZQ na concentração de 160 μ M frente aos vermes jovens de 21 dias foi capaz de provocar a mortalidade de apenas 60%. Vale destacar que na fase adulta, as fêmeas apresentaram uma sensibilidade inferior quando comparado aos machos, apresentando uma CL₅₀ superior. Esses achados já são relatados na literatura conforme Pica-Mattoccia e Cioli (2004), os quais demonstraram a baixa eficácia do PZQ frente ao *Schistosoma mansoni* (Cepa Porto Rico) nas fases jovens de 28 dias, os quais chegaram a se recuperar dos efeitos espasmódicos em concentrações de até 3 μ M. Bem como os vermes adultos fêmeas provenientes de infecções unissexual e bissexual apresentando-se refratárias ao PZQ quando comparadas aos machos.

Embora a eficácia do mecanismo de ação do PZQ frente aos vermes adultos esteja relacionado ao influxo de cálcio e a rápida contração da musculatura, frente as fases jovens este princípio de ação parece ser paradoxal. Os quais são menos sensíveis ao PZQ, apesar de apresentarem canais de cálcio em suas células. Diante disso, estudos moleculares vêm buscando esclarecer os mecanismos de tolerância/resistência das espécies de *Schistosoma* em diferentes estágios evolutivos frente ao praziquantel. A multirresistência das células de mamíferos aos fármacos é associada a uma superfamília de proteínas ABC (ATP-binding-cassette), das quais incluem a glicoproteína-P (PGP, sigla em inglês), a MRP-1 e BCRP (associada ao câncer de mama). Estas são proteínas transportadoras dependentes de ATP responsáveis por eliminar xenobióticos e toxinas metabólicas das células, as quais são altamente expressas em células cancerígenas resistentes a quimioterapia (LEONARD et al. 2003).

Ao passo que as proteínas multirresistentes (MRPs, sigla em inglês) são notavelmente expressas em células tumorais, transportadores semelhantes já foram identificados em helmintos, incluindo *Schistosoma mansoni* (cepa Porto Rico) (SATO et al. 2003; BLACKHALL et al. 2008). Bosch e colaboradores (1994) clonaram e codificaram dois cDNA de *Schistosoma mansoni* responsáveis pela expressão de proteínas multirresistentes, sendo o gene SMDR2 responsável por codificar proteínas semelhante à glicoproteína-P de mamíferos. Devido ao potencial envolvimento desses transportadores na resistência ao PZQ, Messerli e colaboradores (2009) exploraram a relação da expressão do RNA de SMDR2 e da glicoproteína-P em vermes adultos de *S. mansoni* (cepa NMRI) quando expostos a

concentrações subletais de praziquantel. Nesse estudo também foram utilizados vermes EE2 já conhecidos por terem sensibilidade reduzida ao PZQ e vermes CD1 que nunca foram tratados e portanto, sensíveis ao PZQ. A exposição da cepa NMRI revelou um aumento de 3 vezes do RNA de SMDR2 em machos adultos quando comparados ao controle negativo no intervalo de 3 horas. Curiosamente as fêmeas adultas neste mesmo intervalo não apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao grupo controle negativo, em que este ainda apresentou um aumento de 2 a 5 vezes do RNA de SMDR2 quando comparadas aos machos adultos. Vale destacar a baixa sensibilidade das fêmeas frente ao PZQ avaliado em nosso estudo, as quais tiveram uma CL_{50} superior ao macho. Este achado pode estar relacionado aos altos níveis das MRPs. Os vermes adultos da cepa EE2 apresentaram níveis em mais de 2 vezes do RNA de SMDR2 quando comparados aos vermes CD1 e NMRI, bem como os níveis da glicoproteína-P.

Kasinathan e colaboradores (2010) identificaram uma outra proteína envolvida na excreção de xenobióticos, a *SmMRP1* de *Schistosoma mansoni* (cepa NMRI), um homólogo do MRP1 (Proteína associada a resistência de Multidrogas) em células mamíferas. Quando expostos a concentrações subletais do PZQ, a expressão do RNA de *SmMRP1* em vermes jovens e cercárias foi superior ao comparar com os vermes adultos (macho e fêmea). Além disso, o RNA de SMDR2 foi altamente expresso nas fases jovens de *Schistosoma mansoni* (cepa NMRI). A presença desses transportadores de bombas de efluxo aos fármacos podem estar diretamente relacionados a baixa sensibilidade dos esquistossômulos de 3 horas e jovens de 21 dias frente ao PZQ avaliados neste trabalho.

As diferenças na sensibilidade da β -lapachona, β CD- β -lapachona e PZQ avaliado frente as diferentes fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) pode estar relacionadas as diferentes expressões gênicas reguladas positivamente para cada estágio. Em estudos proteômicos com *Schistosoma japonicum* (cepa anhui) realizado por Hong e colaboradores (2013), foi possível identificar proteínas que estão intimamente relacionadas com a sobrevivência e desenvolvimento dos vermes. A ADP-ribose pirofosfatase e a tiorredoxina peroxidase-1, por exemplo, são enzimas extremamente importantes para os processos metabólicos e foram altamente expressos em esquistossômulos de *S. japonicum*. A ADP-ribose pirofosfatase está ligado ao papel protetor, pois evita o acúmulo da ADP-ribose nas células, a qual pode ser prejudicial. Já a tiorredoxina peroxidase-1 está relacionada

a proteção contra os reativos de oxigênio, e sua presença em esquistossômulos de *Schistosoma mansoni* (cepa Porto Rico) também foi identificada (SOTILLO et al. 2015). Na fase adulta essas enzimas continuam sendo expressas, porém em níveis inferiores às fases jovens. No estudo proteômico em vermes adultos de *S. japonicum* (cepa Anhui) destacaram-se por apresentarem proteínas que regulam a expressão gênica e os processos metabólicos. Como a proteína ribossômica LP-1 responsável pelo controle transcricional e a pré-procatepsina C que pode estar envolvida na proteólise de proteínas que são processadas e apresentadas externamente, e conseqüentemente auxiliar na evasão do sistema imune (TURK et al. 2002).

A β -lapachona além de ser bastante explorada em pesquisas antineoplásicas tem sido alvo de pesquisa contra o *Schistosoma mansoni* (Cepa BH). Estudos *in vitro* frente aos vermes machos adultos tem se mostrado eficaz na concentração de 100 μ M, promovendo lesões de tegumento e mortalidade no período de 24 horas (AIRES et al. 2014). O dano causado no tegumento dos vermes é o alvo principal dos fármacos esquistossomicida. Visto que, a membrana tegumentar é responsável pela absorção de nutrientes como lipídeos, aminoácidos e carboidratos, bem como a regulação de íons (Ca^{2+} , H^+ , Na^+ e K^+). Vale ressaltar, que o tegumento é o responsável pela sobrevivência dos vermes, o qual sofre constantes alterações na constituição e adsorve proteínas e lipídeos do hospedeiro escapando do reconhecimento pelo sistema imunológico (ALMEIDA et al. 2003; HELLEMOND et al. 2006; CAMPELO et al. 2017).

No presente estudo, a β -lapachona também foi capaz de provocar a mortalidade em esquistossômulos de 3 horas na taxa de 100% na concentração de 0.975 μ M e frente aos vermes jovens de 21 dias, resultando na mortalidade de 97.37% na concentração de 22 μ M, no período de 24 horas. Esses achados, revelam a eficácia da β -lapachona frente às fases jovens quando comparado ao PZQ no mesmo intervalo. Ressaltando também a susceptibilidade dos vermes adultos fêmeas à β -lapachona, as quais foram mais sensíveis do que os vermes adultos machos.

O mecanismo de ação da β -lapachona ainda não é totalmente elucidado. Em nossas avaliações, as alterações morfológicas provocadas pela β -lapachona apresentaram-se diferentes quando comparado à rápida contração da musculatura longitudinal e danos tegumentares na presença do PZQ. Esses achados corroboram

com a avaliação realizada por AIRES e colaboradores (2014), propondo um mecanismo de ação distinto da β -lapachona.

Os estudos apoiam o papel das quinonas em gerar reativos de oxigênio (ROS) que resultam em danos e morte celular. Segundo Kuntz e colaboradores (2007) e Sharma e colaboradores (2009) as células de *Schistosoma mansoni* possui uma única glutathione tiorredoxina redutase (*SmTGR*, sigla em inglês) que está envolvida na eliminação dos ROS, o que pode explicar a sua sobrevivência frente aos reativos de oxigênio liberados pelas células do sistema imunológico do hospedeiro.

A análise biológica da *SmTGR* (Glutathione Tiorredoxina redutase de *Schistosoma mansoni*) revelou que os vermes de *Schistosoma mansoni* que tiveram sua expressão inibida morreram em um período de 4 até dias. A nível bioquímico, ao determinar a estrutura molecular do *SmTGR* foi possível verificar diferenças de especificidades nos substratos quando comparados aos homólogos de mamíferos. Estudos *in vitro* com alvos no *SmTGR* já foram explorados através de derivados sintéticos de 1,4-naftoquinonas, os quais se mostraram promissores ao inibir o *SmTGR* de *S. mansoni* (LANFRANCHI et al. 2012; JOHANN et al. 2015). Esses resultados podem contribuir para a elucidação da atividade da β -lapachona no seu papel de gerar ROS e em inibir a ação do sistema redox nas células de *Schistosoma mansoni*.

A β -lapachona em sua forma livre é uma molécula hidrofóbica, e consequentemente apresenta baixa solubilidade em meio aquoso. Essa limitação dificulta a continuação de estudos *in vivo* por vias de administração menos invasiva, como a via oral. Uma das alternativas aplicadas pela química farmacêutica para melhorar a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos hidrofóbicos tem sido a inclusão das moléculas em excipientes, o qual tem a finalidade de conduzir o fármaco na sua forma íntegra, segura e eficaz ao alvo biológico desejado (KURKOV e LOFTSSON, 2012). Nesse sentido, exploramos a atividade da β -lapachona no complexo de inclusão β -ciclodextrina frente as diferentes fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (Cepa BH). Os resultados presentes nas tabelas 4, 7 e 10 revelam que a ação da β -lapachona permaneceu inalterada frente as fases evolutivas de *Schistosoma mansoni*, enquanto o grupo controle negativo na presença isolada da β -ciclodextrina permaneceram normais. Revelando a ausência

de atividade quando complexada a β -lapachona. Enquadrando-a dessa forma como um excipiente eficaz na solubilidade do composto no meio.

A eficácia *in vivo* do PZQ no tratamento da esquistossomose mostra que a mortalidade dos vermes depende da associação dos fatores da defesa imunológico do hospedeiro definitivo. Uma vez que *in vitro* os vermes de *Schistosoma mansoni* (cepas Porto Rico e LE) foram capazes de se recuperar dos danos tegumentares e funcionais após serem expostos ao praziquantel (PICAMATTOCCIA e CIOLI, 2004; OLIVEIRA et al. 2006). Dessa forma, a associação de outros fármacos ao PZQ pode ser uma alternativa para aumentar a eficácia no tratamento da esquistossomose, ampliando até mesmo o espectro de ação para as fases jovens. Além disso, a associação de fármacos tem reduzido os efeitos adversos proporcionado pela diminuição da dose administrada isoladamente. Destacando também, que este método terapêutico evita ou reduz significativamente o aparecimento de resistência aos fármacos.

Alguns estudos já têm explorado a associação do PZQ com outros compostos, como na combinação do omeprazol e PZQ *in vitro* realizado por Almeida e colaboradores (2015) que revelou resultados promissores frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Cepa LE). Campelo e colaboradores (2017) também têm demonstrado resultados satisfatórios ao associar piplartine e epiisopiloturine ao PZQ frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Cepa BH) *in vitro*. Por fim, estudos *in vitro* e *in vivo* envolvendo antimaláricos como arthemeter e mefloquina combinados com o PZQ mostraram-se eficazes frente as espécies de *Schistosoma mansoni* e *S. japonicum* (UTZINGER, et al. 2001; MAHMOUD e BOTROS, 2005; KEISER, et al. 2011; GOUVEIA et al. 2018).

Em nossos trabalhos hipotetizamos que a β -lapachona livre e a β CD- β -lapachona combinadas ao PZQ seriam capazes de promover atividade sinérgica sobre fases evolutivas do *S. mansoni*. Os resultados indicaram atividade sinérgica da associação PZQ e β -ciclodextrina- β -lapachona/PZQ frente a vermes adultos, vermes jovens e esquistossômulos resultando em lesões tegumentares semelhantes e superiores quando comparadas as avaliações isoladas de cada fármaco em concentrações superiores. Já a combinação das proporções inferiores a 0,5CL₅₀ da β -lapachona livre e da β CD- β -lapachona mostrou variações de susceptibilidade quando combinadas às variáveis do PZQ.

7 PERSPECTIVAS

- Investigar as demais concentrações subinibitórias frente aos esquistossômulos com 3 horas;
- Realizar a microscopia eletrônica de varredura (MEV) das concentrações que apresentaram resultados promissores, com a finalidade de detalhar as alterações tegumentares causados pela combinação dos fármacos;
- Investigar *in vivo* a atividade da β CD- β -lapachona, por administração oral, frente as fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH). Visto que o ensaio *in vitro* limita-se apenas a avaliação da solubilidade da β -lapachonano complexo de inclusão. Não avaliando a absorção e metabolismo da droga;
- Investigar *in vivo* a combinação quimioterápica da β CD- β -lapachona/PZQ nas diferentes fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH).

8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, podemos concluir que a β -lapachona livre e no complexo de inclusão β -ciclodextrina apresentaram atividade esquistosomicida frente as fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH). Em que o complexo de inclusão β -ciclodextrina melhorou a solubilidade da β -lapachona, proporcionando a eficácia quando comparada a forma livre.

A combinação da β -lapachona livre e β CD- β -lapachona com o PZQ foi capaz de provocar alterações tegumentares e mortalidade nas diferentes fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) no intervalo de 24 horas. Além disso, a atividade promovida pela associação abre novas possibilidades para investigações adicionais *in vivo* da combinação desses fármacos, que poderá estabelecer a eficácia do tratamento associado.

Por conseguinte, a associação de fármacos ao praziquantel abre novas possibilidades para o tratamento da esquistossomose por meio da combinação de pequenas doses individuais. Concomitantemente, proporciona a potencialização terapêutica, redução dos efeitos adversos e eliminação das chances no surgimento de cepas resistentes ao próprio PZQ, bem como aos futuros quimioterápicos.

REFERÊNCIAS

- AIRES, A. L. et al. Ultrastructural analysis of β -lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Experimental Parasitology**. 142: 8 μ –90, 2014.
- ALMEIDA, G. T. et al. Synergy of omeprazole and praziquantel *in vitro* treatment against *Schistosoma mansoni* adult worms. **PLoS Negl Trop Dis**. 9 (9): e0004086, 2015.
- ALMEIDA, V. S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nat. Genet**. 35 (2): 148-157, 2003.
- ANJOS, D. O. et al. Effects of a novel belapachone derivative on *Trypanosoma cruzi*: Parasite death involving apoptosis, autophagy and necrosis. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. 6(3): 207-219, 2016.
- ARAÚJO, N. et al. Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental Schistosomiasis mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**.103(5): 450-454, 2008.
- BARBOSA, C. S. et al. Casos autóctones de esquistossomose mansônica em crianças de Recife, PE. **Rev. Saúde Pública**. 47(4): 684-90, 2013.
- BARBOSA, C. S. et al. Current epidemiological status of schistosomiasis in the state of Pernambuco, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** .105 (4): 549-554, July 2010.
- BARBOSA, C. S. et al. Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá, Estado de Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**. 34 (4): 337-41, 2000.
- BARBOSA, C. S. et al. Epidemiologia da esquistossomose no litoral de Pernambuco. **Rev. Patol. Trop**. 43 (4): 436-445, 2014.
- BARBOSA, T. P.; NETO, H. D. Preparação de derivados do lapachol em meio ácido e em meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de química orgânica experimental. **Quim. Nova**. 36 (2): 331-334, 2013.
- BASHIRI, K. et al. The role of latency reversal agents in the cure of hiv: A review of current data. **Immunology Letters**. 2018.
- BERGQUIST, R. et al. Controlling schistosomiasis with praziquantel: How much longer without a viable alternative?. **Infectious Diseases of Poverty**. 6(74): 1-10, 2017.
- BLACKHALL, W. J. et al. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. **Vet. Parasitol**. 152 (1-2): 101-107, 2008.
- BOSCH, I. B. et al. Two *Schistosoma mansoni* cDNAs encoding ATP-binding

cassette (ABC) family proteins. 65 (2): 351-356, 1994.

BOTROS, S. S. et al. Current status of sensitivity to praziquantel in a focus of potential drug resistance in Egypt. **International Journal for Parasitology**. 35: 787–791, 2005.

BRACHS, S.; HASS, W. et al. Swimming behaviour of *Schistosoma mansoni* cercariae: responses to irradiance changes and skin attractants. **Parasitol Res**. 102:685-690, 2008.

BRASIL, M. S. **Vigilância da esquistossomose mansoni: diretrizes técnicas**. 4. ed. Brasília: Ministério da Saúde. 2014. 144p.

BRILHANTE, R. S. M. et al. Terpinen-4-ol, tyrosol, and β -lapachone as potential antifungals against dimorphic fungi. **Brazilian Journal of Microbiology**. 47: 917–924, 2016.

CARVALHO, O. S. et. al. Distribuição espacial de *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*, hospedeiros intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil. In: CARVALHO, O. S., COELHO, P. M. Z., and LENZI, H. L., orgs. *Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro. FIOCRUZ, 2008, pp. 393-418.

CARVALHO, S. A. Tratamento da Esquistossomose Mansoni. **Rev. Med**. 64(1): 17-20, 1982.

CAVALCANTI, M. G. S. et al. Ultrastructural and cytochemical aspects of *Schistosoma mansoni* cercaria. **Micron**. 40: 394-400, 2009.

CHIA-TUNG, S, et al. Review: *Schistosoma mansoni*: the ultrastructure of larval morphogenesis in *Biomphalaria glabrata* and of associated host-parasite interactions. **Jpn. J. Med. Sci. Biol**. 49:129-149, 1996.

CHOI, Y. H. et al. Phosphorylation of p53, induction of Bax and activation of caspases during β -lapachone-mediated apoptosis in human prostate epithelial cells. **International Journal of Oncology**. 21: 1293-1299, 2002.

CHOU, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. **Cancer Res**. 70 (2): 440-447, 2010.

CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever?. **Molecular & Biochemical Parasitology**. 195: 23-29, 2014.

COELHO, J. R.; BEZERRA, F. S. M. et al. The effects of temperature change on the infection rate of *Biomphalaria glabrata* with *Schistosoma mansoni*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 101 (2): 223-224, 2006.

COLUCCI, M. A. et al. Natural and synthetic quinones and their reduction by the quinone reductase enzyme NQO1: from synthetic organic chemistry to compounds with anticancer potential. **Organic & Biomolecular Chemistry**. 6:637-656, 2007.

COUTO, F. F. B. et al. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Mem Inst Oswaldo Cruz**.106(2): 153-157, 2011.

CURWEM, R. S.; WILSON, R. A. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. **Trends in Parasitology**. 19:2, 2003.

DOENHOFF, M. J. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. **Parasitology**.136: 1825–1835, 2009.

DOENHOFF, M. J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**. 21:659–667, 2008.

DORSEY, C. H. et al. Review: Ultrastructure of the *Schistosoma mansoni* cercaria. **Micron**. 33:279-323, 2002.

EYONG, K. O. et al. Conversion of lapachol to lomatiol: synthesis of novel naphthoquinone derivatives. **New Journal of Chemistry**. 2015.

FAVRE, T. C. et al. Reliability of current estimates of schistosomiasis prevalence in the Rainforest Zone of the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 101:73-78, 2006.

FERRARI, M. L. A. et al. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bulletin of the World Health Organization**. (81) 3:190-96, 2003.

GOLAN, David. E. et al. **Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2^aed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOMES, E. C. S. et al. Risk analysis for occurrences of schistosomiasis in the coastal area of Porto de Galinhas, Pernambuco, Brazil. **BMC Infectious Diseases**. 14:101, 2014.

GOUVEIA, M. J. et al. Drug Repurposing for Schistosomiasis: Combinations of Drugs or Biomolecules. **Pharmaceuticals**. 11(1): 1-34, 2018.

GREENBERG, R. M. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action?. **International Journal for Parasitology**. 35: 1–9, 2005.

GRIMES, J. E.T. et al. The Relationship between Water, Sanitation and Schistosomiasis: A Systematic Review and Meta-analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 8(12): e3296, 2014.

GRYSSELS, B. et al. Human schistosomiasis. **Lancet Infect. Dis**. 368:1106-18, 2006.

- GUPTA, D. et al. β -lapachone, a novel plant product, overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. **Experimental Hematology**. 30: 711-720, 2002.
- HAEBERLEIN, S.; HASS, W. et al. Chemical attractants of human skin for swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. **Parasitol Res**. 102:657-662, 2008.
- HE, Y. X. et al. Comparison of skin invasion among three major species of *Schistosoma*. **Trends in Parasitology**. 21:5, 2005.
- HELLEMOND, J. J. V. et al. Functions of the tegument of schistosomes: Clues from the proteome and lipidome. **International Journal for Parasitology**. 36(6): 691-699, 2006.
- HONG, Y. et al. Proteomics analysis of differentially expressed proteins in schistosomula and adult worms of *Schistosoma japonicum*. **Acta Tropica**. 126(1): 1-10, 2013.
- HOTEZ, P. J. NTDs V.2.0: "Blue Marble Health"- Neglected Tropical Disease Control and Elimination in a Shifting Health Policy Landscape. **PLoS Negl Trop Dis**. 7(11): e2570, 2013.
- HUSSAIN, H. et al. Lapachol: an overview. **Arkivoc**. (2):145-171, 2007.
- HUSSAIN, H.; GREEN, I. R. et al. Lapachol and lapachone analogs: A journey of two decades of patent research (1997-2016). **Expert Opinion on Therapeutic Patents**. 10: 1111-1121, 2017.
- ISMAEL, M. et al. Resistance to praziquantel: direct evidence from *schistosoma mansoni* isolated from egyptian villagers. **Am. J. Trop. Med. Hyg**. 60 (6):932-935, 1999.
- JAMBHEKAR, S. S.; BREEN, P. Cyclodextrins in pharmaceutical formulations I: structure and physicochemical properties, formation of complexes, and types of complex. **Drug Discovery Today**. 2 (21): 356-362, 2016.
- JAURÉGUIBERRY, S. et al. Acute schistosomiasis, a diagnostic and therapeutic challenge. **Clin. Microbiol. Infect**. 16:225-231, 2009.
- JEZIORSKI, M. C.; GREENBERG, R. M. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: Potential role in praziquantel action. **International Journal for Parasitology**. 36: 625-632, 2006.
- JOHANN, L. et al. Synthesis and evaluation of 1,4-naphthoquinone ether derivatives as *SmtGR* inhibitors and new antischistosomal drugs. **FEBS J**. 282(16): 3199-3217, 2015.
- KAMEL, R. O. A. et al. Ultrastructural alterations in *Schistosoma mansoni* juvenile and adult male worms after in vitro incubation with primaquine. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 112 (4): 247-254, 2017.

KASINATHAN, R. S. et al. Modulation of a *Schistosoma mansoni* multidrug transporter by the antischistosomal drug praziquantel. **Faseb J.** 24 (1): 128-135, 2010.

KATZ, N. The discovery of *Schistosomiasis mansoni* in Brazil. **Acta Tropica.** 108:69-71, 2008.

KEE, J. Y. et al. β -lapachone inhibits lung metastasis of colorectal cancer by inducing apoptosis of CT26 cells. **Integrative Cancer Therapies.** 1-12, 2016.

KEISER, J. et al. Interactions of mefloquine with praziquantel in the *Schistosoma mansoni* mouse model and *in vitro*. **J Antimicrob Chemother.** 66(8):1791-1797, 2011.

KUNTZ, A. N. et al. Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: An Essential Parasite Enzyme and a Key Drug Target. **PLoS Med.** 4(6): e206, 2007.

KURKOV, S. V.; LOFTOSSON, T. Cyclodextrins. **International Journal of Pharmaceutics.** 453: 167– 180, 2012.

LAGO, E. M. et al. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. **FutureMed. Chem.** 10 (1): 89-120, 2017.

LAI, W. F. et al. Chemistry and engineering of cyclodextrins for molecular imaging. **Chem. Soc. Rev.** 46: 6379-6419, 2017.

LAI, Y. et al. Spatial distribution of schistosomiasis and treatment needs in sub-Saharan Africa: a systematic review and geostatistical analysis. **The Lancet Infect Dis.** 15: 927-40, 2015.

LANFRANCHI, D. A. et al. Synthesis and Biological Evaluation of 1,4-Naphthoquinones and Quinoline-5,8-diones as Antimalarial and Schistosomicidal Agents. **Org Biomol Chem.** 10(31): 6375-6487, 2012.

LÈHAR, J. et al. Synergistic drug combinations improve therapeutic selectivity. **Nat Biotechnol.** 27(7): 659–666, 2009.

LEONARD, G. D. et al. The role of ABC transporters in Clinical Practice. **Oncologist.** 8 (5): 411-424, 2003.

LI, J. Z. et al. Mechanistic studies of cancer cell mitochondria- and NQO1-mediated redox activation of beta-lapachone, a potentially novel anticancer agent. **Toxicology and Applied Pharmacology.** 281:285–293, 2014.

LUNA, C. M. et al. Tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina na América Latina. **Braz J Infect Dis.** 14 (2):121-129, 2010.

MACEDO, L. et al. β -Lapachone activity in synergy with conventional antimicrobials against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* strains. **Phytomedicine.** 21: 25– 29, 2013.

- MACHADO-SILVA, J. R. et al. Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** (93) 1: 303-307, 1998.
- MAHMOUD, M. R.; BOTROS, S. S. Artemether as adjuvant therapy to praziquantel in murine egyptian schistosomiasis *mansoni*. **Journal of Parasitology.** 91(1): 175-178, 2005.
- MARTINEZ, E. M. et al. Características biológicas e morfológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 36 (5): 557-564, 2003.
- McKERROW, J. J. et al. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. **Trends in Parasitology.** 19:2, 2003.
- MELMAN, S. D. et al. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis** 3(8): e504, 2009.
- MESSERLI, S. M. et al. *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility. **Mol. Biochem. Parasitol.** 167 (1): 54-59, 2009.
- MEULEMAN, E. A. et al. Development of daughter sporocysts inside the mother sporocyst of *Schistosoma mansoni* with special reference to the ultrastructure of the body wall. **Z. Parasitenkd.** 61: 201-212, 1980.
- MILLER, P.; WILSON, R. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from the lungs to the hepatic portal system. **Parasitology.** 80: 267-288, 1980.
- MONE, H.; BOISSIER, J. et al. Sexual biology of Schistosomes. **Advances in Parasitology.** Vol 57, 2004.
- MS, Ministério da Saúde. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Rev. Saúde Pública.** 44(1):200-202, 2010.
- NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana.** 11ªed. Rio de Janeiro: Atheneu. 2004.
- NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana.** 12ªed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011.
- NOVAES, M. R C. G. et al. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. **Química Nova.** 22(1): 5-10, 1999.
- OKDAH, L. et al. New therapy from old drugs: Synergistic bactericidal activity of sulfadiazine with colistin against colistin-resistant bacteria, including plasmid

mediated colistin-resistant *mcr-1* isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 2018.

OLIVEIRA, F. A. et al. Responses of the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to treatment with praziquantel and other biomolecules. **Parasitology**. 132 (pt 1): 321-330, 2006.

OLIVERIA, S.M. et al. A Resposta do *Schistosoma mansoni* mantido in vitro frente a derivados imidazolidinônicos. **Acta Farm. Bonaerense**. 3 (23): 343-348, 2004.

PEREIRA, A. S. A. et al. Morphological and morphometric study of cercariae and adult worms of *Schistosoma mansoni* (SLM strain) isolated from infected mice. **Parasitol Res**. 112 (3): 1087-96, 2012.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. **International Journal for Parasitology**. 34 (4): 527-533, 2004.

PINK, J. J. et al. NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase Activity Is the Principal Determinant of β -Lapachone Cytotoxicity. **The Journal of Biological Chemistry**. 275 (8): 5416-5424, 2000.

PINTO, A. V.; CASTRO, S. L. The trypanocidal activity of naphthoquinones: A review. **Molecules**. 14:4570-4590, 2009.

PINTO, R. M. et al. Autoradiographic analysis of *Schistosoma mansoni* migration in NZ rabbit. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 85 (1): 91-94, 1990.

PLANER, J. D. et al. Synergy testing of FDA-approved drugs identifies potent drug combinations against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Negl Trop Dis**. 8(7): e2977, 2014.

ROCHA, T. J. M. et al. Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**. 7(2): 27-32, 2016.

ROSS, A. G. P. et al. Katayama syndrome. **Lancet Infect. Dis**. 7 (3): 218-24, 2007.

ROSS, A. G. P. et al. Schistosomiasis. **The New England Journal of Medicine**. 346 (16): 1212-20, 2002.

SABRA, A. N. A.; BOTROS, S. S. Response of *Schistosoma mansoni* isolates having different drug sensitivity to praziquantel over several life cycle passages with and without therapeutic pressure. **J. Parasitol**. 94 (2): 537-541, 2008.

SALAS, C. et al. *Trypanosoma cruzi*: Activities of lapachol and α - and β -lapachone derivatives against epimastigote and trypomastigote forms. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**. 16: 668–674, 2008.

SALVADOR-RECATALA, V. et al. Atypical properties of a conventional calcium channel β subunit from the platyhelminth *Schistosoma mansoni*. **BMC Physiology**. 8:6, 2008.

SANTOS, T. M. et al. Anthelmintic activity of lapachol, β -lapachone and its derivatives against *Toxocara canis* larvae. **Rev. Inst. Med. Trop.** 57 (3): 197-204, 2015.

SATO, H. et al. Excretion of fluorescent substrates of mammalian multidrug resistance-associated protein (MRP) in the *Schistosoma mansoni* excretory system. **Parasitology**. 128 (pt 1): 43-52, 2003.

SCHOLTE, R. G. C. et al. Predictive risk mapping of schistosomiasis in Brazil using Bayesian geostatistical models. **Acta Tropica**. 132: 57-63, 2013.

SEVES-PE, **Plano Integrado de Ações para o Enfretamento às Doenças Negligenciadas no Estado de Pernambuco/ SANAR – 2015 - 2018 /Secretaria Estadual de Saúde**. 1ªed. Recife: Secretaria Estadual de Saúde, 2015. 46p.

SHARMA, M. et al. Comparative modeling of thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: A multifunctional target for antischistosomal therapy. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**. 27(6): 665-75, 2009.

SILVA, V. B. R. et al. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. 25: 3259-3277. 2017.

SKELLY, P. J.; WILSON, R. A. Making Sense of the Schistosome Surface. **Advances in Parasitology**. 63: 185-284, 2006.

SOTILLO, J. et al. A quantitative proteomic analysis of the tegumental proteins from *Schistosoma mansoni* schistosomula reveals novel potential therapeutic targets. **Int J Parasitol**. 45 (8): 505-516, 2015.

SOUSA, E. T. et al. Fontes, formação, reatividade e determinação de quinonas na atmosfera. **Quim. Nova**. 39 (4): 486-495, 2016.

STELLA, V. J.; HE, Q. Cyclodextrins. **Toxicologic Pathology**. 36:30-42, 2008.

TALLARIDA, R. J. Drug Synergism: Its Detection and Applications. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. 3 (298): 865-872, 2001.

TIWARI, G. et al. Cyclodextrins in delivery systems: Applications. **J Pharm Bioall Sci**. 2 (2): 72-79, 2010.

TURK, V. et al. Lysosomal cathepsins: structure, role in antigen processing and presentation, and cancer. **Adv. Enzyme Regul**. 42: 285-303, 2002.

UNIVERSIDADE DO PANAMÁ. **Esporocisto**. Disponível em: <<http://www.telmeds.org/atlas/parasitologia/clase-trematode/ciclo-de-vida-evolutivo/esporocisto/>>. Acesso em 24/03/2018.

UNIVERSIDADE DO PANAMÁ. **Schistosoma mansoni** Verme adulto macho. Disponível em: <<http://www.telmeds.org/atlas/parasitologia/clase-trematode/schistosoma-sp/schistosoma-mansoni/schistosoma-mansoni-verme-adulto-macho/>>. Acesso em 24/03/2018.

UTZINGER, J. et al. Effect of combined treatment with praziquantel and artemether on *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in experimentally infected animals. **Acta Tropica**. 80 (2001): 9-18, 2001.

VALLE, E. M. M. Cyclodextrins and their uses: a review. **Process Biochemistry**. 39: 1033–1046, 2004.

VILLAMIL, S. F. et al. Redox cycling of β -lapachone and structural analogues in microsomal and cytosol liver preparations. **Methods in Enzymology**. 378: 67-87, 2004.

WANG, W. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. **Parasitol. Res.** 111:1871-1877, 2012.

WATSON, M. et al. Praziquantel. **Journal of Exotic Pet Medicine**.3: 229-231, 2009.

WHEATER, P. R.; WILSON, R. A. *Schistosoma mansoni*: a histological study of migration in the laboratory mouse. **Parasitology**. 79:49-62, 1979.

WHO, World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/news/Egypt_leverages_domestic_funding_to_eliminate_schistosomiasis/en/>. Acesso em 16/03/2017.

WHO, World Health Organization. **Schistosomiasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em 16/03/2017.

WHO, World Health Organization. **Sustaining the drive to overcome the global impact of neglected tropical diseases**. Disponível em: <www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html> Acesso em 16/03/2017.

WILSON, R. A. The saga of schistosome migration and attrition. **Parasitology**. 136: 1581-1592, 2009.

WILSON, R.; COULSON, P. S. *Schistosoma mansoni*: dynamics of migration through the vascular system of the mouse. **Parasitology**. 92: 83-100, 1986.

WOO, H. J. et al. β -Lapachone, a Quinone Isolated from *Tabebuia avellanedae*, Induces Apoptosis in HepG2 Hepatoma Cell Line Through Induction of Bax and Activation of Caspase. **J Med Food**. 9 (2): 161–168, 2006.

WU, Y. et al. β -lapachone induces NAD(P)H:Quinone Oxidoreductase-1– and Oxidative Stress–Dependent Heat Shock Protein 90 cleavage and inhibits tumor growth and angiogenesis. **J Pharmacol Exp Ther**. 357:466–475, 2016.

YU, H. Y. et al. β -lapachone-Induced Apoptosis of Human Gastric Carcinoma AGS Cells Is Caspase-Dependent and Regulated by the PI3K/Akt Pathway. **Biomol Ther.** 22(3): 184-192, 2014.

ZONI, A. C. et al. Schistosomiasis Prevalence and Intensity of Infection in Latin America and the Caribbean Countries, 1942-2014: A Systematic Review in the Context of a Regional Elimination Goal. **PLoS Neglected Tropical Diseases.** (10)3: e0004493, 2016.

ZONI, A. C.;CATALÁ, L. **Prevalencia e Intensidad de Infección de esquistosomiasis en los países de Latinoamérica y el Caribe, 1942-2014.** Organización Panamericana de la Salud, 2015.

ANEXO A- Aprovação do CEUA/UFPE



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8321
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 01 de setembro de 2017.

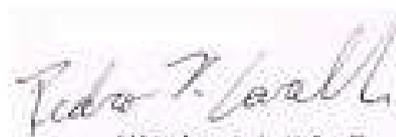
Ofício nº 86/17

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Prof.ª Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
Departamento de Medicina Tropical
Centro de Ciências da Saúde
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.016190/2017-55

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação esquistossomida da associação β -lapachona/Praziquantel complexados β -ciclodextrina", registrada com o nº 23076.016190/2017-55, sob a responsabilidade de Prof.ª Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE), em reunião de 30/08/2017.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	03/09/2017 a 29/09/2018
Espécie/Inhagem/raça	Camundongos heterogênicos Swiss
Nº de animais	60
Peso/Idade	28-30g / 30 dias
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do LIKA-UFPE

Atenciosamente,


 Prof. Dr. Pedro V. Carelli
 Presidente da CEUA / CC3 - UFPE
 UFPE - CAPE 1001584