



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

RENAN ANDRADE FERNANDES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ESQUISTOSSOMICIDA DA
ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA/PRAZIQUANTEL**

Recife
2020

RENAN ANDRADE FERNANDES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ESQUISTOSSOMICIDA DA
ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA/PRAZIQUANTEL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.
Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

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

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

Recife

2020

Catálogo na fonte
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

S729a Souza, Renan Andrade Fernandes de
Avaliação in vitro do potencial esquistossomicida da associação
miltefosina/ praziquantel/ Renan Andrade Fernandes de Souza. –
2020.

81 f.: il.; tab.

Orientadora: Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências da Saúde-CCS. Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas. Recife, 2020.

Inclui referências e anexo.

1. Miltefosina. 2. Praziquantel. 3. Esquistossomicida. 4.
Sinergismo. 5. Schistosoma mansoni. I Albuquerque, Mônica Camelo
Pessoa de Azevedo (Orientadora). II. Título.

615.1 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2020-078)

RENAN ANDRADE FERNANDES DE SOUZA

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO POTENCIAL ESQUISTOSSOMICIDA DA
ASSOCIAÇÃO MILTEFOSINA/PRAZIQUANTEL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Fármacos e medicamentos.

Aprovada em: 27/02/2020.

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

Hianna Arely M. Fagundes Silva (Titular Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho aos meus pais. Durante a execução de toda parte escrita do mesmo, e em boa parte dos experimentos, meu pai esteve internado e minha mãe o acompanhava nas internações. Aos meus pais, com amor!

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ter sonhado para mim e realizado por mim os sonhos que eu jamais cogitei viver. Minha infinita gratidão.

A minha família por todo o apoio, pelo sustento e por acreditarem em mim quando eu mesmo não acreditava. Em especial aos meus pais Mário e Raquel, minhas irmãs Rafaela, Juliana, Luciana, Júlia e Viviane pelos incentivos de várias formas. Aos meus cunhados Thiago, Sandro e Faguinho pelas ajudas inesperadas. Aos meus sobrinhos Flora, Chico, Camila, Mylena, Tiago e Vítor pelo carinho imensurável de sempre. E as minhas tias Albani e Avani por tudo.

A minha orientadora Profa. Dra. Mônica Camelo Pessôa de Azevedo Albuquerque, pela oportunidade, pelo voto de confiança, por vibrar em cada conquista, pelas risadas e por ser uma orientadora-mãe mais ícone que eu já vi, como também ao coorientador Prof. Dr. André de Lima Aires pelos ensinamentos e pelas ajudas fundamentais na execução do projeto.

Aos amigos de laboratório Débora, Camilla, Paulo, Lucas e Thais que fizeram essa caminhada ser mais fácil. Em especial ao meu amigo Victor Hugo que vestiu a camisa comigo e lutou lado a lado.

Aos meus amigos Isadora, Carla, Thalita, Will, Thayná, Laura, Ellen, Sara, Karina e Natan, por todo bem que só um amigo é capaz de fazer.

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

RESUMO

A esquistossomose é a segunda parasitose de maior importância epidemiológica, está presente nas Américas Central e do Sul, África e Ásia. No Brasil, aproximadamente 30 milhões de pessoas estão sob risco de infecção e estima-se que de 4 a 6 milhões de pessoas estejam infectadas com esta doença que é negligenciada. Para combater a infecção, o único fármaco eficaz disponível é o praziquantel (PZQ), atuante contra todas as espécies do gênero *Schistosoma*. No entanto, o PZQ tem apresentado algumas falhas terapêuticas, como a baixa eficácia contra as fases mais jovens do verme, não previnem reinfeções e submete-se a riscos de resistência em áreas endêmicas pois é a única droga há mais de 40 anos. Desta forma, este trabalho objetivou avaliar o potencial esquistossomicida, *in vitro*, da miltefosina (MTF) em associação com o PZQ sobre diferentes fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) que parasitam o homem, bem como a avaliação do perfil de oviposição dos vermes acasalados após uma exposição a doses subletais da associação. Caramujos *Biomphalaria glabrata* foram infectados com miracídios de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) para obtenção de cercárias, após 30 dias, utilizadas no processo mecânico de transformação em esquistossômulos, usados no ensaio após 3 horas. Camundongos fêmeas *Swiss webster* foram anestesiados e infectados em via percutânea com 120 cercárias. Após os intervalos de 21 e 50 dias de infecção foram eutanasiados e, respectivamente, recuperados vermes jovens e adultos por perfusão hepática. Foi observada a susceptibilidade das diferentes fases evolutivas *in vitro* frente à MTF e PZQ no intervalo de 24 horas para estabelecer as LC₅₀, sendo respectivamente 37,3µM e 173,8µM para esquistossômulos de 3 horas; 40,9µM e 96,5µM para vermes jovens com 21 dias; 187,7µM e 96,57µM para verme adulto macho e 108,6µM e 79,9µM para verme adulto fêmea. A associação da MTF/PZQ atuou em sinergismo na concentração associada da CL₅₀ e subinibitórias frente a vermes jovens e adultos macho e fêmea. A associação MTF/PZQ apresentou relevante efeito inibitório na oviposição dos vermes acasalados expostos a doses subletais da associação por 48 horas, avaliados em meio livre de drogas por 72 horas.

Palavras-chave: Miltefosina. Praziquantel. Esquistossomicida. Sinergismo. *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

Schistosomiasis is the second parasitic disease of greatest epidemiological importance, it is present in Central and South America, Africa and Asia. In Brazil, approximately 30 million people are at risk of infection and it is estimated that 4 to 6 million people are infected with this neglected disease. To combat infection, the only effective drug available is praziquantel (PZQ), active against all species of the genus *Schistosoma*. However, PZQ has shown some therapeutic flaws, such as low efficacy against the younger stages of the worm, does not prevent reinfection and is subject to resistance risks in endemic areas as it has been the only drug for over 40 years. Thus, this study aimed to evaluate the schistosomicidal potential, in vitro, of miltefosina (MTF) in association with the PZQ on different evolutionary stages of *Schistosoma mansoni* (strain BH) that parasitize man, as well as the evaluation of the worms oviposition profile mated after exposure to sublethal doses of the combination. *Biomphalaria glabrata* snails were infected with *Schistosoma mansoni* miracidia (BH strain) to obtain cercariae, after 30 days, used in the mechanical transformation process in schistosomules, used in the test after 3 hours. Swiss webster female mice were anesthetized and infected percutaneously with 120 cercariae. After 21 and 50 days of infection, they were euthanized and, respectively, young and adult worms were recovered by liver perfusion. The susceptibility of the different evolutionary phases in vitro to MTF and PZQ was observed within 24 hours to establish the LC50, being 37.3 μ M and 173.8 μ M for 3-hour schistosomules, respectively; 40.9 μ M and 96.5 μ M for young worms 21 days old; 187.7 μ M and 96.57 μ M for adult male worm and 108.6 μ M and 79.9 μ M for adult female worm. The association of MTF / PZQ acted in synergism in the associated concentration of LC50 and subinhibitory against young worms and male and female adults. The MTF / PZQ association had a relevant inhibitory effect on the maturation of mated worms exposed to sublethal doses of the association for 48 hours, evaluated in a drug-free medium for 72 hours.

Key words: Miltefosine. Praziquantel. Schistosomicidal. Synergism. *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição mundial da esquistossomose.....	17
Quadro 1 –	Características das principais espécies do gênero <i>Schistosoma</i> e suas respectivas distribuições geográficas.....	18
Figura 2 –	Incidência e prevalência da esquistossomose na América Latina.....	19
Figura 3 –	Regiões prevalentes e pontos focais da esquistossomose mansoni no Brasil.....	20
Quadro 2 –	Relação da distribuição das três principais espécies do caramujo hospedeiro intermediário nos estados do Nordeste.....	21
Figura 4 –	Distribuição espacial dos casos de esquistossomose registrados no Hospital das Clínicas – PE nos anos de 2010 a 2012 por local de contato com coleções hídricas no Estado de Pernambuco.....	21
Quadro 3 –	Distribuição das frequências dos municípios com registros de caso onde houve contato com coleções hídricas nos anos de 2010 a 2012.....	22
Figura 5 –	Ovo não operculado de <i>Schistosoma mansoni</i>	24
Figura 6 –	Miracídio em microscopia eletrônica de varredura.....	25
Figura 7 –	Esporocistos de <i>Schistosoma mansoni</i> em corte histológico, tecido de caramujo do gênero <i>Biomphalaria</i>	26
Figura 8 –	Fotomicrografia de cercaria.....	27
Figura 9 –	Imagem de Esquistossômulo em microscopia óptica invertida.....	28
Figura 10 –	Vermes jovens de <i>Schistosoma mansoni</i>	29
Figura 11 –	Canal ginecóforo do macho albergando a fêmea. Detalhe da fenda longitudinal do macho com a fêmea interiorizada.....	29
Figura 12 –	Verme adulto macho totalmente maturado apresentando	

	bem definidas a ventosa ventral, ventosa oral e canal ginecóforo.....	30
Figura 13 –	Verme adulto fêmea, corpo cilíndrico apresentando estruturas apontadas nas setas.....	30
Figura 14 –	Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	32
Figura 15 –	Caramujos planorbídeos do gênero <i>Biomphalaria</i>	32
Figura 16 –	Estrutura molecular do Praziquantel.....	37
Figura 17 –	Fórmula estrutural da Miltefosina (MTF).....	39
Figura 18 –	Gráficos dos índices de combinações em relação ao efeito das diferentes combinações.....	63
Figura 19 –	Isobogramas normalizados indicando os IC representados por cada ponto individual no gráfico.....	63
Figura 20 –	Isobogramas normalizados indicando os IC representados por cada ponto individual no gráfico	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Score de motilidade, expresso em percentagem, de esquistossômulos com 3 horas, controles e tratados com miltefosina em 24h de incubação.....	50
Tabela 2 –	Score de motilidade, expresso em percentagem, de esquistossômulos com 3 horas controles e tratados com praziquantel em 24h de incubação.....	51
Tabela 3 –	Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes jovens com 21 dias controles e tratados com miltefosina em 24h de incubação.....	52
Tabela 4 –	Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes jovens com 21 dias controles e tratados com praziquantel em 24h de incubação.....	53
Tabela 5 –	Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes adultos machos com 50 dias controles e tratados com miltefosina em 24h de incubação.....	54
Tabela 6 –	Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes adultos machos com 50 dias controles e tratados com praziquantel em 24h de incubação.....	55
Tabela 7 –	Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes adultos fêmeas com 50 dias controles e tratados com miltefosina em 24h de incubação.....	56
Tabela 8 –	Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes adultos fêmeas com 50 dias controles e tratados com praziquantel em 24h de incubação.....	57
Tabela 9 –	Efeito da miltefosina com praziquantel sobre esquistossômulos de <i>S. mansoni</i> (cepa BH) com 3 horas após 24 horas.....	59
Tabela 10 –	Efeito da miltefosina com praziquantel sobre vermes jovens de <i>S. mansoni</i> (cepa BH) com 21 dias após 24 horas.....	60
Tabela 11 –	Efeito da miltefosina com praziquantel sobre vermes	

	adultos machos de <i>S. mansoni</i> (cepa BH) com 50 dias após 24 horas.....	61
Tabela 12 –	Efeito da miltefosina com praziquantel sobre vermes adultos fêmeas de <i>S. mansoni</i> (cepa BH) com 50 dias após 24 horas.....	62
Tabela 13 –	Efeito da associação miltefosina/praziquantel em doses subletais baseadas na LC ₅₀ de Vermes adultos machos sobre a oviposição de vermes fêmeas em cópula de <i>S. mansoni</i> (cepa BH) após 120 horas.....	65
Tabela 14 –	Efeito da associação miltefosina/praziquantel em doses subletais baseadas na LC ₅₀ de Vermes adultos fêmeas sobre a oviposição de vermes fêmeas em cópula de <i>S. mansoni</i> (cepa BH) após 120 horas.....	65

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E GEOGRÁFICOS DA ESQUISTOSSOMOSE.....	16
2.2	<i>Schistosoma mansoni</i>	23
2.2.1	Aspectos biológicos e morfológicos nas diferentes fases evolutivas.....	23
2.2.2	Ciclo biológico.....	31
2.2.3	Patogenia.....	35
2.2.4	Tratamento.....	37
2.2.5	Miltefosina.....	39
2.2.6	Associação de fármacos: aplicações e finalidades.....	41
3	OBJETIVOS.....	43
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	43
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	44
4.2	COMPOSTOS.....	44
4.3	INFECÇÃO DE CARAMUJOS, OBTENÇÃO DE CERCÁRIAS E INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS COM <i>Schistosoma mansoni</i> (CEPA BH)	45
4.4	AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE IN VITRO DOS ESQUISTOSSÔMULOS COM 3 HORAS FRENTE A MILTEFOSINA E PRAZIQUANTEL	45
4.5	AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE IN VITRO DOS VERMES JOVENS COM 21 DIAS FRENTE A MILTEFOSINA E PRAZIQUANTEL.....	46
4.6	AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE IN VITRO DOS VERMES ADULTOS COM 50 DIAS FRENTE A MILTEFOSINA E PRAZIQUANTEL.....	46
4.7	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA	

	ASSOCIAÇÃO MTF/PZQ FRENTE ÀS DIFERENTES FASES EVOLUTIVAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> (CEPA BH)	47
4.8	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ASSOCIAÇÃO MTF/PZQ FRENTE À OVIPOSIÇÃO DE FÊMEAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> (CEPA BH) EM CÓPULA.....	47
4.9	CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO.....	47
5	RESULTADOS.....	50
5.1	AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE IN VITRO DE ESQUISTOSSÔMULOS DE 3 HORAS FRENTE A MILTEFOSINA E PRAZIQUANTEL.....	50
5.2	AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE IN VITRO DOS VERMES JOVENS (21 DIAS) FRENTE A MILTEFOSINA E PRAZIQUANTEL.....	52
5.3	AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE IN VITRO DOS VERMES ADULTOS MACHOS (50 DIAS) FRENTE A MILTEFOSINA E PRAZIQUANTEL.....	53
5.4	AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE IN VITRO DOS VERMES ADULTOS FÊMEAS (50 DIAS) MILTEFOSINA E PRAZIQUANTEL.....	55
5.5	EFEITO DA COMBINAÇÃO MTF-PZQ CONTRA ESQUISTOSSÔMULOS, VERMES JOVENS E VERMES ADULTOS MACHOS E FÊMEAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> (CEPA BH)	58
5.6	EFEITO DA COMBINAÇÃO MTF-PZQ EM CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS FRENTE À OVIPOSIÇÃO DE FÊMEAS DE <i>Schistosoma mansoni</i> (CEPA BH) EM CÓPULA.....	63
6	DISCUSSÃO.....	66
7	PERSPECTIVAS.....	72
8	CONCLUSÃO.....	73
	REFERÊNCIAS.....	74
	ANEXO A- APROVAÇÃO DO CEUA/UFPE.....	81

1 INTRODUÇÃO

A falta de investimentos em infraestruturas de saneamento básico é um fator agravante para problemas de saúde pública. Tal fato destaca a problemática de doenças negligenciadas que protagonizam a realidade de regiões carentes sem sistemas sanitários. Por serem regiões de baixa movimentação econômica, as instituições farmacêuticas não visualizam o retorno financeiro suficiente para que haja uma mobilização de forma integral (HOTEZ, 2013; BRASIL, 2014).

Desta forma, a esquistossomose é uma doença parasitária endêmica principalmente nestas regiões. Causada por vermes do gênero *Schistosoma* de classe Trematoda, caracteriza-se como doença negligenciada, sendo a segunda parasitose de maior importância epidemiológica. Estima-se que por volta de 250 milhões de pessoas no mundo já estejam infectadas com a esquistossomose. A doença está presente no continente Africano (*Schistosoma haematobium* e *Schistosoma mansoni*), Asiático (*Schistosoma japonicum*) e Sul Americano (*Schistosoma mansoni*) (WHO, 2017; NAFTALE-KATZ, 2018).

O Brasil é o país sul americano com maior prevalência da doença. Dentre os Estados brasileiros, os que compõem a região nordestina somam a maior endemia do país. De todas as unidades federativas brasileiras, 19 são endêmicos para esquistossomose, destes, Sergipe, Alagoas, Bahia e Pernambuco são os mais endêmicos. Fora da região Nordeste, os Estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro também apresentam importância epidemiológica. Em 2015, o Ministério da Saúde levantou dados que afirmam Pernambuco como o Estado com os maiores índices de internações e óbitos do Brasil, em 2016 o Estado de Alagoas ficou em primeiro lugar e em 2017 o Estado de Sergipe. (BRASIL, 2014; MS, 2016; NAFTALE-KATZ, 2018).

A esquistossomose apresenta sua clínica a partir do desenvolvimento do parasito dentro do hospedeiro, desta forma divide-se em duas fases: aguda e crônica. Dentre essas fases, a crônica é intimamente ligada aos índices de óbito por apresentar a forma mais grave da doença, a hepatoesplênica. Ainda nesta fase, as reações inflamatórias tornam-se mais severas devido ao acúmulo de ovos no tecido e vasos hepáticos, levando o órgão a um estado fibrótico alterando toda sua arquitetura e fisiologia. Alguns casos mais severos ainda apresentam o aumento e

perda de função de outros órgãos, como o baço e intestino, podendo levar o indivíduo a um quadro de ascite, varizes esofagianas e por fim o óbito (GRYSEELS et al. 2006).

O praziquantel (PZQ) é uma 2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino{2,1-a}isoquinolina-4-ona, um derivado pirazinoisoquinolina. Fármaco de primeira escolha para tratamento da doença por ser seguro e eficaz frente a todas as espécies de *Schistosoma*. Mesmo com todas essas características de uma droga ideal, o PZQ apresenta falhas terapêuticas que necessitam ser sanadas. Possui baixa eficácia contra as fases jovens do verme, não ameniza ou reverte os danos causados pela infecção, não impede reinfecções e apresenta sérios riscos de resistência por ser a única droga disponível para a doença há mais de 40 anos. Diante disso, estudos são realizados em busca de novos caminhos para o tratamento da esquistossomose, que também venham suprir essas falhas do PZQ descritas (SILVA et al. 2017).

Um fármaco de particular interesse como candidato à terapia é a miltefosina (MTF), um derivado alquillisofosfolipídio, conhecido como alquilfosfocolina originalmente desenvolvido como anticancerígeno. Recentemente foi relatada sua propriedade esquistossomicida *in vivo* apresentando vantagem quando comparada ao PZQ por ser eficaz contra diferentes estágios de desenvolvimento de *Schistosoma mansoni*. As promissoras propriedades esquistossomicida da Miltefosina fazem-na uma droga atraente para o tratamento em associação com o praziquantel (Eissa et al, 2011).

A associação de diferentes medicamentos, usando dosagens menores do que aquela considerada curativa para cada um deles é uma alternativa para aumentar a eficácia terapêutica e constitui uma nova forma de utilização. Esse recurso é eficaz para minimizar ou evitar o aparecimento de resistência e diminuir os efeitos colaterais e tóxicos. Vários tratamentos se beneficiam da associação medicamentosa, como por exemplo, o tratamento da tuberculose, malária e câncer (TALLARIDA et al. 2001). A associação drogas bem conhecidas, que apresentam efeito esquistossomicida, com o PZQ como uma alternativa ao tratamento da esquistossomose é promissora, além disso, a redução das doses do PZQ e da MTF, minimiza os riscos no surgimento de cepas resistentes frente aos fármacos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

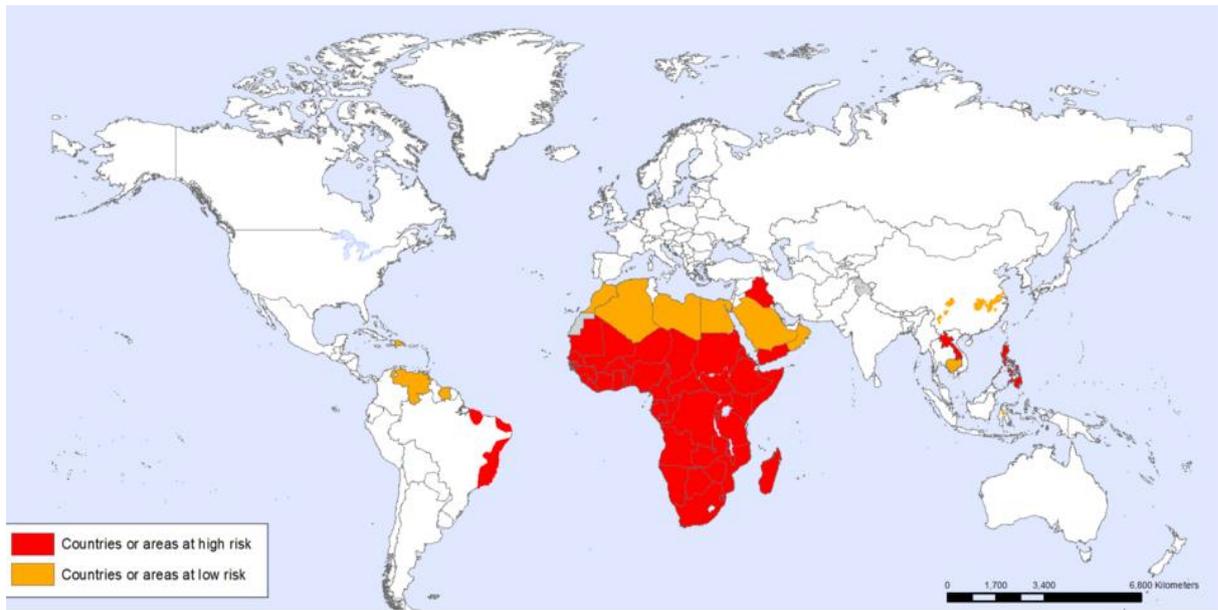
2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E GEOGRÁFICOS DA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose acomete cerca de 250 milhões de pessoas em 78 países. Deste número, estão estimadas, ao ano, mais de 200 mil mortes. Sua prevalência destaca-se em países subdesenvolvidos com climas tropicais e subtropicais, atingindo regiões com escassez de saneamento básico e culminando na formação de regiões focais endêmicas em aglomerados urbanos. Só em 2015, estima-se que mais de 66 milhões de pessoas foram submetidas ao tratamento padrão da doença (WHO, 2017).

A doença não deve ser considerada apenas um fenômeno biológico devido aos contextos sociais específicos em que está envolvida. Desse modo, denota-se que a esquistossomose está incluída em amplos contextos sociais, políticos e econômicos, excluindo-a da simples definição de doença tropical. Considerada como problema de saúde pública, está conectada ao baixo desenvolvimento onde há a necessidade de reutilização de águas naturais, por muitas vezes contaminadas, para fins econômicos ou lazer (SILVA, 2011; GRIMES et al. 2014).

Os agentes etiológicos das esquistossomoses, espécies do gênero *Schistosoma*, estão distribuídos nas Américas Central e do Sul, África e Ásia (figura 1). As severas lesões decorrentes da persistência dos parasitos nos seus respectivos hospedeiros, somadas ao fator epidemiológico elevam a esquistossomose à segunda doença parasitária de maior relevância, ficando atrás apenas da malária. Alguns fatores justificam, ao mesmo passo que potencializam, a crescente distribuição deste mal, como serviço público de saúde e condições socioeconômicas precários, falta de saneamento básico e fluxos migratórios. Segundo a Organização Mundial de Saúde, a esquistossomose é uma das parasitoses mais disseminadas no mundo entre as que afetam o homem, sendo uma das doenças mais prevalentes entre as veiculadas pela água. (MASSARA, 2008; BRASIL, 2014)

Figura 1 - Distribuição mundial da esquistossomose.



Fonte: (WHO, 2015).

O gênero *Schistosoma* apresenta cinco espécies de maior importância epidemiológica, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* e *Schistosoma japonicum*. A espécie *S. japonicum* está localizada em países do continente asiático, enquanto *S. haematobium* está localizada no Oriente Médio e África, onde também é encontrada a espécie *S. mansoni*, porém esta ainda é endêmica na América Latina. Outras duas espécies acometem indivíduos a nível mais focal, são *Schistosoma intercalatum* nas Áfricas Central e Oriental e *Schistosoma mekongi*, na bacia do rio Mekong (COLLEY, 2014).

De acordo com a localidade e exposição a diferentes condições ambientais, cada espécie do gênero *Schistosoma* adquiriu características adaptativas que singularizam uma espécie da outra, como está descrito no Quadro 1 a seguir:

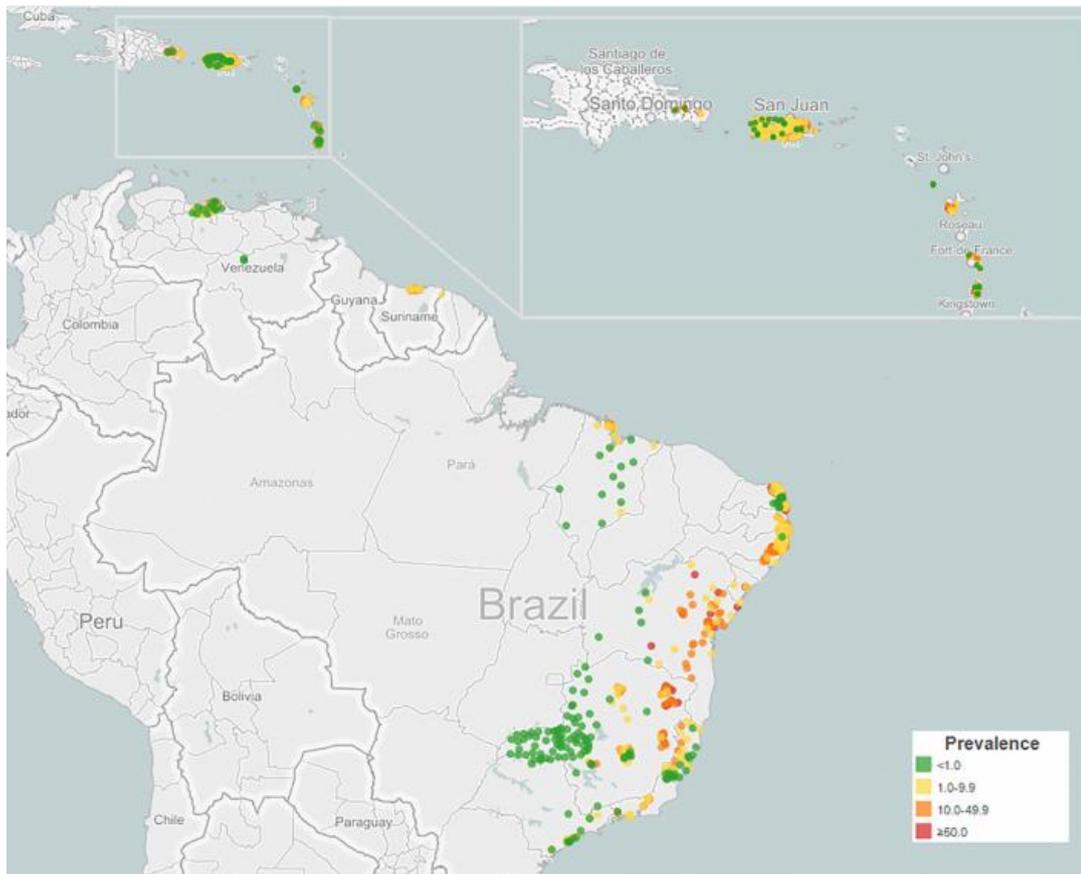
Quadro 1 - Características das principais espécies do gênero *Schistosoma* e suas respectivas distribuições geográficas. Fonte: SANTOS, 2018 modificado

Espécie	Morfologia do ovo	Habitat do verme adulto	Hospedeiro intermediário	Distribuição geográfica
<i>Schistosoma mansoni</i>	Com espículo lateral	Sistema Porta	<i>Biomphalaria sp</i>	África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname
<i>Schistosoma japonicum</i>	Ovoide com espículo lateral	Sistema Porta	<i>Oncomelania sp</i>	China, Indonésia, Filipinas
<i>Schistosoma mekongi</i>	Ovoide com rudimento de espículo lateral	Sistema Porta	<i>Neotricula aperta</i>	Distritos do Camboja e da República Democrática popular do Laos
<i>Schistosoma intercalatum</i>	Elipsoide com espículo terminal	Sistema Porta	<i>Bulinus sp</i>	Florestas Tropicais da África Central
<i>Schistosoma haematobium</i>	Elipsoide com espículo terminal	Vênulas do plexo vesical,	<i>Bulinus sp</i>	África, Oriente Médio, Córsega (França).

Fonte: SANTOS, 2018 modificado

Como observado no quadro acima, *S. mansoni* e *S. haematobium* são as espécies de maior importância no continente africano por sua larga prevalência. Neste continente estão a grande maioria dos casos conhecidos da doença, chegando a quase 90%. Na América Latina, estudos apontam a grande prevalência de casos no Brasil, superando países como Suriname, Guadalupe, República Dominicana, Caribe, Santa Lucia e Venezuela. No Brasil, as regiões mais endêmicas são distribuídas principalmente no litoral do País e no Estado de Minas Gerais. Dados epidemiológicos reunidos entre 1942 e 2014 apontam o Brasil como destaque na prevalência da doença desde a década de 40 frente a países sulamericanos com 58,4% dos registros realizados, como mostra na Figura 2 os denominados *hot spots* (ZONI et al. 2014).

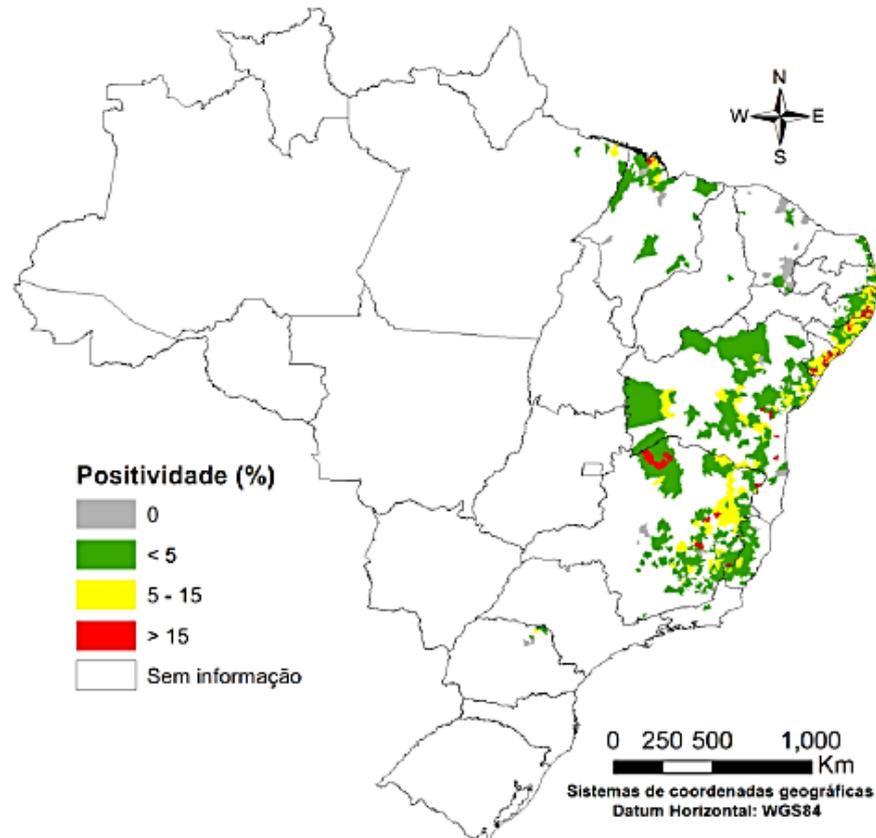
Figura 2 - Incidência e prevalência da Esquistossomose na América Latina.



Fonte: ZONI et al. 2016

No Brasil, todos os estados do Nordeste são endêmicos e somam a maior prevalência do país para esquistossomose, sobretudo Sergipe, Alagoas, Bahia e Pernambuco. Fora da região nordestina, os Estados de Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro também apresentam índices consideráveis de prevalência da parasitose como mostra a Figura 3. Atualmente, a falta de regularidade nos registros da doença entre diferentes regiões pode ser atribuída a melhorias no controle da doença, falta de recursos para estudos epidemiológicos ou ainda ao surgimento de outras importantes doenças vetoriais como foco de estudo. Contudo, não houve êxito na erradicação ou diminuição maior que 5% no relato de casos reais de indivíduos esquistossomóticos (NAFTALE-KATZ, 2018; ZONI et al., 2015; SILVA, 2011).

Figura 3 - Regiões prevalentes e pontos focais da Esquistossomose mansoni no Brasil.



Fonte: Serviço de Vigilância em Saúde/MS, 2018

Um fator primordial para a manutenção e expansão da doença em um determinado lugar é a presença de hospedeiros definitivos e intermediários compatíveis com o verme *S. mansoni*. Os hospedeiros intermediários são caramujos do gênero *Biomphalaria*, dentre as espécies do gênero, as três que naturalmente infectadas, são *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. Onde coexistirem hospedeiros intermediários e definitivos mediante uma infecção pelo *S. mansoni*, o verme poderá se perpetuar e propagar a doença (BRASIL, 2014; CARVALHO et al., 2008).

Observando o contexto histórico, Pernambuco era endêmico apenas em áreas rurais (COUTINHO, 1997; CAMPOS 2014). A urbanização e modificação da infraestrutura das cidades, bem como o êxodo rural justificam a expansão da doença no Estado para regiões antes não endêmicas (ARAUJO et al. 2007).

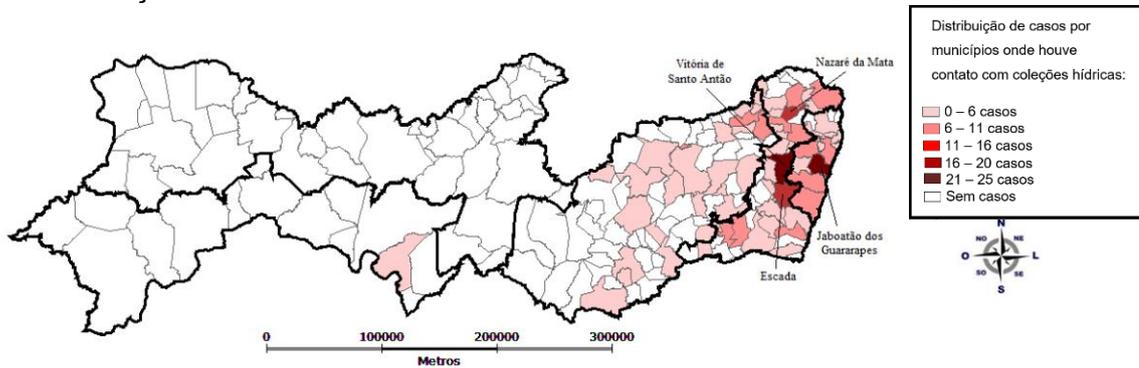
Estima-se que quase 102 dos 185 municípios de Pernambuco sejam endêmicos para esquistossomose, principalmente nas regiões da Zona da Mata e Litoral. Nessas localidades, os maiores índices de infecção são de regiões banhadas pelas bacias dos rios Una, Capibaribe, Goiana, Jaboatão, Sirinhaém e Ipojuca. Acreditava-se que nessas regiões a principal forma de infecção seria durante banhos nos rios das cidades, porém um estudo realizado pela Fiocruz em Ipojuca relatou que a maior parte dos hospedeiros intermediários do gênero *Biomphalaria* sitiada em aglomerados de areia das lojas de construções e nos quintais das casas provenientes de enchentes. Uma análise feita pelo centro de pesquisa relatou que 48% dos caramujos estavam infectados por *S. mansoni* (BARBOSA et al., 2001; CAMPOS 2014; MINISTÉRIO DA SAÚDE 2011).

Quadro 2 - Relação da distribuição das três principais espécies do caramujo hospedeiro intermediário nos estados do Nordeste

ESTADOS	NÚMERO DE MUNICÍPIOS		
	<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

Fonte: CARVALHO et al. 2008; SANTOS, 2018

Figura 4 - Distribuição espacial dos casos de esquistossomose registrados no Hospital das Clínicas – PE nos anos de 2010 a 2012 por local de contato com coleções hídricas no Estado de Pernambuco. FONTE: CAMPOS, 2014.



Fonte: CAMPOS, 2014.

Quadro 3 - Distribuição das frequências dos municípios com registros de caso onde houve contato com coleções hídricas nos anos de 2010 a 2012.

Municípios com registros de contato com coleções hídricas	Quantidade de casos	%	Mesorregião
Vitória de Santo Antão	25	8.4	Zona da Mata
Jaboatão dos Guararapes	21	7.1	Metropolitana
Escada	19	6.4	Zona da Mata
Nazaré da Mata	18	6.1	Zona da Mata
Aliança	9	3.0	Zona da Mata
Limoeiro	9	3.0	Zona da Mata
Rio Formoso	9	3.0	Zona da Mata
São Lourenço da Mata	9	3.0	Metropolitana
Carpina	8	2.7	Zona da Mata
Palmares	8	2.7	Zona da Mata
Recife	8	2.7	Metropolitana
Timbaúba	8	2.7	Zona da Mata
Goiana	7	2.4	Metropolitana
Bom Jardim	6	2.0	Agreste
Cabo de Santo Agostinho	6	2.0	Metropolitana
Catende	6	2.0	Agreste
Ipojuca	6	2.0	Metropolitana
Paudalho	6	2.0	Zona da Mata
Camaragibe	5	1.7	Metropolitana
Chã de Alegria	5	1.7	Zona da Mata
Gravatá	5	1.7	Agreste
Moreno	5	1.7	Metropolitana
Paulista	5	1.7	Metropolitana
Vicência	5	1.7	Zona da Mata
São Vicente Férrer	4	1.4	Zona da Mata
Água Preta	3	1.0	Zona da Mata
Barreiros	3	1.0	Zona da Mata
Caruaru	3	1.0	Agreste
João Alfredo	3	1.0	Zona da Mata
Ribeirão	3	1.0	Zona da Mata
Demais localidades	59	20.2	
TOTAL	296	100	

Fonte: CAMPOS, 2018

Segundo a portaria SVS/MS nº 104, de 25 de janeiro de 2011, a esquistossomose é uma doença de notificação compulsória nas áreas endêmicas. Por ser endêmica principalmente da mesorregião da Zona da Mata, era considerada como uma doença de área rural apenas, só vindo a ser notificada no litoral a partir dos anos 90. Com tudo isso, a vigilância epidemiológica da doença busca notificar compulsoriamente os casos comprovados laboratorialmente, investigar os casos e realizar ações de controle dos infectados, bem como promover medidas de prevenção e controle (BARBOSA, 2013; FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE, 2007).

2.2 *Schistosoma mansoni*

2.2.1 Aspectos morfológicos de *Schistosoma mansoni* nas diferentes fases evolutivas

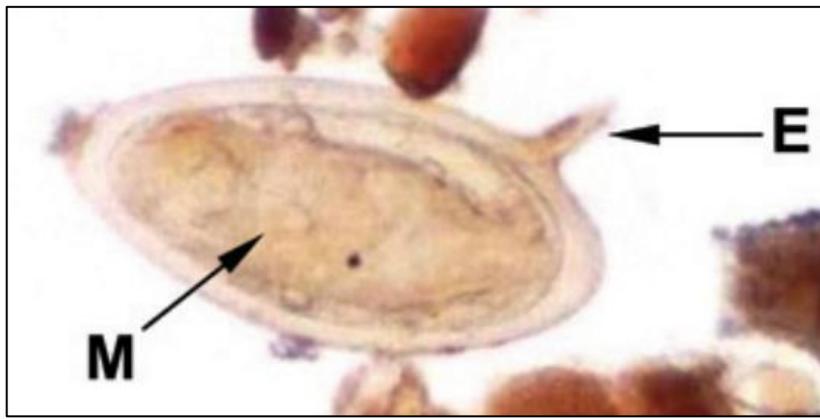
Diferentes formas evolutivas são encontradas no ciclo de vida de *Schistosoma*, cujas características morfológicas e fisiológicas atendem as necessidades de sobrevivência e desenvolvimento no meio em que estão expostas. São elas: ovo, miracídio, esporocisto, cercária, esquistossômulo e vermes adultos.

O ovo (Figura 5) é composto por células produzidas nas glândulas vitelínicas e no ovário. Acredita-se que o ovo fertilizado já possua o sexo do verme definido. Os ovos são caracterizados por uma casca porosa e transparente com microespinhos distribuídos em sua superfície. Interiormente é composto basicamente por células vitelínicas e mitocôndrias, gordura e vesículas de inclusões granulares. Possui dupla membrana que estão em contato uma com a outra, a membrana interna da casca do ovo e a membrana vitelínica (ASHTON et al., 2001; MICHAEL, KNOBLOCH e KUNZ, 2003).

Durante o desenvolvimento o ovo passa por diversos estádios de maturação, sendo eliminado nas fezes quando está no estágio maduro (CARVALHO et al., 2008). Os ovos maduros possuem o miracídio interiorizado e medem 150µm de comprimento e 65µm de largura, sendo o maior ovo dentre os helmintos. São de fácil reconhecimento em microscopia óptica por possuírem o espículo lateral, característico desta espécie. Apesar de cada ovo possuir tradicionalmente um único

miracídio, há relatos de ovos albergando dois miracídios em seu interior (DIAS&RIBEIRO, 1980). Após a eliminação do ovo junto às fezes, mantém-se viável por até 5 dias, sendo necessário contato com água, luminosidade e temperatura adequada para a eclosão do miracídio e continuação de seu ciclo de vida (BRASIL, 2014; SILVA et al, 2008).

Figura 5 - Ovo de *Schistosoma mansoni*. Miracídio (**M**) interiorizado e espículo lateral (**E**) na parte mais larga.



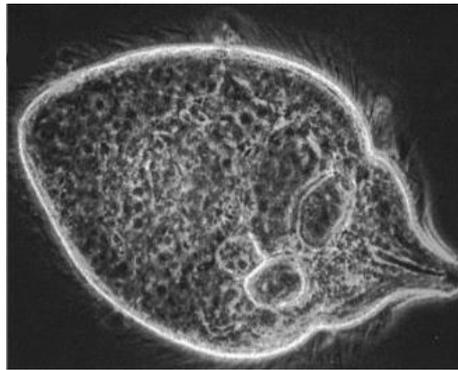
Fonte: SILVA et al., 2009).

O miracídio (Figura 6) é uma larva aquática ciliada, mede aproximadamente 160-180µm de comprimento por 60µm de largura. Suas estruturas biológicas existem basicamente para o nado, penetração e reprodução assexuada no interior do molusco. Em sua superfície existem 21 placas epidérmicas ciliadas que ajudam no nado à lâmina da água. Em sua porção anterior possui o *terebratorium*, que nada mais é do que uma papila apical conectada a glândulas que auxiliarão na adesão e penetração da larva no molusco (EKLU-NATEY et al., 1985).

Diferentemente de outros trematódeos, o miracídio não possui glândulas cefálicas, porém já é descrito um sistema sensível à luz sustentando o fototropismo positivo desta larva de *S. mansoni*. (VERJOVSKI-ALMEIDA et al., 2003). Após a eclosão, nadam ativamente até encontrar um hospedeiro onde tentará penetrar, porém o ciclo só terá sua continuidade se este hospedeiro for compatível biologicamente.

Existe um mecanismo de especificidade entre a larva de *S. mansoni* e o molusco, mediado por quimiorreceptores ligados às células nervosas do miracídio. Esses quimiorreceptores interagem com substâncias do muco produzido pelos caramujos. Glicoconjugados (80-300 KDa) presentes na superfície do molusco *Biomphalaria* são o *start* para o processo de localização realizado pelos miracídios, ao ponto de seus movimentos intensificarem ao entrarem em contato com coleções aquáticas previamente habitadas por espécies do *Biomphalaria* (HASSAN et al., 2003). A penetração pode ocorrer em qualquer região das partes moles do caramujo, durando em média de 3-15 minutos.

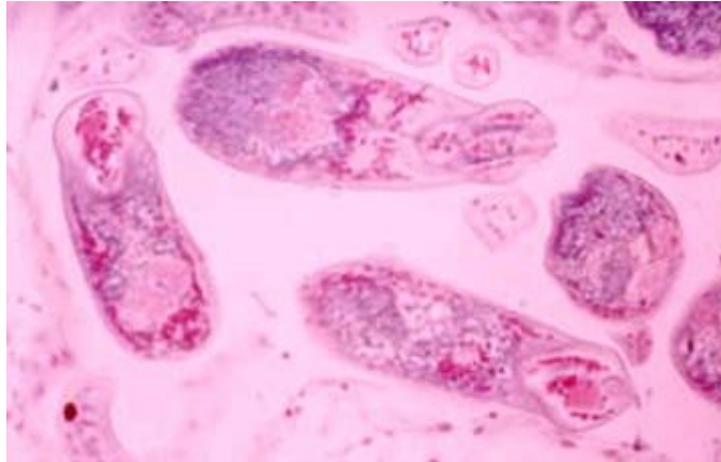
Figura 6 - Miracídio em microscopia eletrônica de varredura. Observar as estruturas de penetração na extremidade direita da imagem e os cílios que recobrem a larva.



Fonte: www.aber.ac.uk acessado em 03/01/2020.

A completa mudança de ambiente refletida por novas condições de temperatura, oxigenação, pH, entre outras alterações, fazem com que o miracídio sofra rápidas e necessárias reestruturações para sua sobrevivência e desenvolvimento no interior do caramujo. Nas primeiras duas horas o miracídio perde a camada de placas ciliadas e todas as estruturas externas, passando a ser um saco alongado, sendo agora designado esporocisto primário ou esporocisto-mãe. O esporocisto (Figura 7) não apresenta sistema digestivo, desta forma, a absorção de todos os nutrientes necessários ocorre por via tegumentar. O tegumento recém-formado é rico em mitocôndrias, retículo endoplasmático, ribossomos, lipídios e glicogênio. Essas estruturas mantêm uma conexão com algumas células remanescentes superficiais (CHIA-TUNG, 1996; YOSHINO, BOYLE & HUMPHRIES, 2001).

Figura 7 - Esporocistos de *Schistosoma mansoni* em corte histológico, tecido de caramujo do gênero *Biomphalaria*.



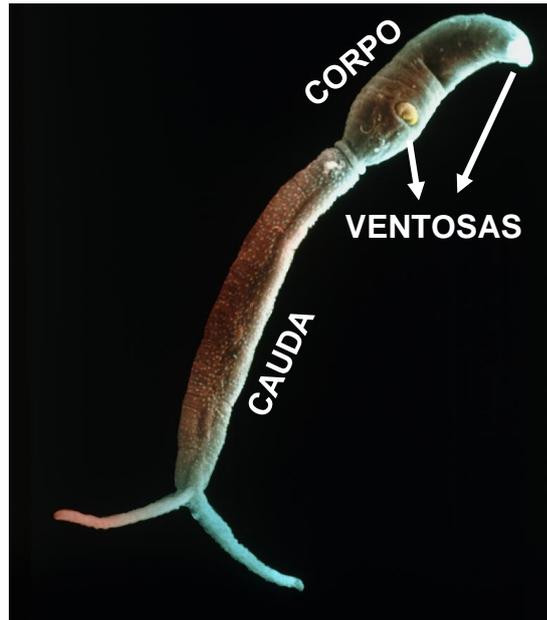
Fonte: C. F. A. Bruijning.

Após 72h as células germinativas se tornam mais proeminentes e alongadas, ao centro do esporocisto ocorre uma diferenciação para formação de uma câmara de maturação. Nesta câmara, as células germinativas se reproduzirão assexuadamente por poliembrião. Em menos de uma semana o esporocisto secundário (ou esporocisto filho) se separa do esporocisto primário e migra para as glândulas digestivas do caramujo (BRUSCA & BRUSCA, 1990). A nova estrutura se torna cada vez mais alongada à medida que as células se proliferam e vão se diferenciando pouco a pouco em cercárias. A ideia da formação de um terceiro esporocisto, sustentada por alguns autores, pode justificar o fato da liberação cercariana não ocorrer exaustivamente numa única vez, assim liberando cercárias pouco a pouco acompanhando o ritmo da maturação e diante da exposição aos estímulos ambientais necessários (MEULEMAN et al., 1980; BAYNE & GREVELDING, 2003).

A cercaria (Figura 8) é um organismo acelomado, mede cerca de 500µm de comprimento, corpo cilíndrico alongado e uma cauda bifurcada na extremidade final, essencial para o nado. No corpo cercariano localizam-se as estruturas fundamentais para a formação do verme adulto, são encontradas as ventosas oral e ventral, células musculares, nervosas e do sistema digestivo, as papilas sensoriais, sistema de osmorregulação e os corpos celulares germinativos que desenvolverão os órgãos reprodutivos dos vermes adultos. Também são encontrados espinhos direcionados

para trás em toda sua estrutura. Possui um tegumento sincicial com uma região citoplasmática anucleada ligada a uma membrana basal contínua e com corpos celulares no parênquima. Seu tegumento é coberto por numerosas fibrilas, denominadas glicocálix, um complexo de oligossacarídeos que garantem a permeabilidade da cercaria, entre outras funções. (DORSEY et al., 2002).

Figura 8 - Fotomicrografia de cercária.



Fonte: Nibsc, 2013.

A cauda cercariana é uma estrutura temporária, consistindo em um órgão locomotor que é deixado para trás no ato da penetração. É formada por uma musculatura longitudinal e circular com porções de fibras transversais que permitirão que as furcas funcionem impulsionando o nado cercariano. A cercária faz proveito de sinais químicos da pele para fazer contato com o hospedeiro, como o ácido linoleico, o complexo acetabular participa na escolha do melhor lugar para que seja feita a invasão na derme e na liberação de substâncias proteolíticas, tanto para a penetração quanto para a migração interna na derme do hospedeiro (CURWEM et al. 2003; HE et al. 2005).

Após a penetração do corpo cercariano no hospedeiro, a cauda se desprende e passa a ser denominado esquistossômulo (Figura 9), o qual depara-se com um novo ambiente que lhe expõe a condições de temperatura, pH e oxigenação diferentes do ambiente externo. *S. mansoni*, então, é estimulado a rearranjar-se

fisiologicamente e estruturalmente em seu tegumento para sobreviver a todas as alterações de ambiente e concluir seu desenvolvimento. É uma fase transitória caracterizada pela adaptabilidade do verme passando da vida livre para uma vida parasitária (SKELLY E SHOEMAKER, 2000).

Figura 9 - Imagem de Esquistossômulo em microscopia óptica invertida.



Fonte: Do autor.

Em seguida o esquistossômulo cai na corrente circulatória sanguínea ou linfática e enfrenta barreiras, que ainda não são bem elucidadas. Autores atribuem à elastase cercariana, produzida pela glândula pré-acetabular, a destruição dessas barreiras biológicas. (MCKERROW, 2003).

A migração ocorre paralelamente à pele em canais superficiais até que desembocam em camadas mais profundas da pele. Por não possuírem sensibilidade à luz, guiam-se por gradientes químicos do soro humano (como L-arginina e D-glicose) e células endoteliais (GRABE & HAAS, 2004). Ao deixarem a pele, invadem vasos sanguíneos e migram para os pulmões dentro de 4 ou 5 dias após a infecção. Nessa etapa os esquistossômulos apresentam algumas alterações morfológicas, como um alongamento e estreitamento de seu formato, medindo 400µm em média, com espinhos nas extremidades anterior e posterior (MC-LAREM, 1980).

Ao chegarem ao fígado, os vermes jovens (Figura 10) iniciam a organogênese, que ocorre por volta dos 21 dias após infecção. Diferente da maioria dos trematódeos, o sistema reprodutor do verme macho não possui o cirro como

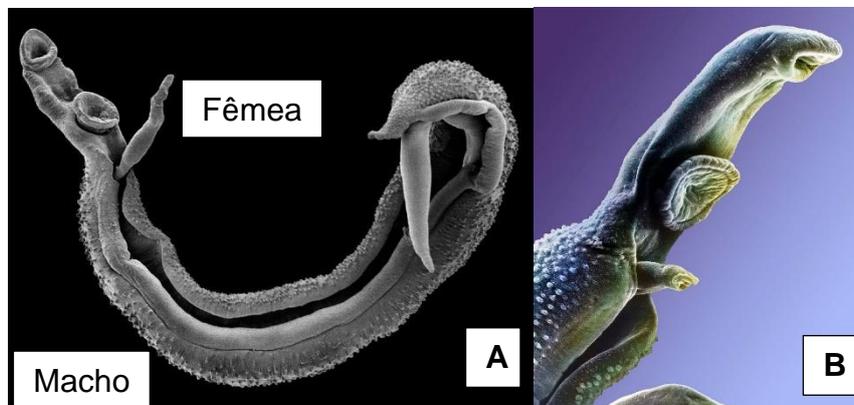
órgão copulador e apresenta mais de um testículo. Aos poucos os vermes machos (Figura 11) vão desenvolvendo a fenda longitudinal, denominada canal ginecóforo (Figura 12), enquanto a fêmea (Figura 13) apresenta um útero primitivo e estrias profundas e organizadas no tegumento. Após quatro semanas, a gametogênese completa-se e os machos apresentam oito lobos testiculares. A superfície do corpo da fêmea se apresenta mais lisa e a do macho com pequenos tubérculos, espinhos na porção dosal. Neste período as fêmeas apresentam um pequeno ovário, o ootipo inicia o seu desenvolvimento (MCLAREN, 1980; CARVALHO, 2008).

Figura 10 - Vermes jovens de *Schistosoma mansoni*. **A)** Verme jovem apresentando estruturas do tubo digestivo e ventosa oral. **B)** Vermes jovens em diversos estádios de diferenciação.



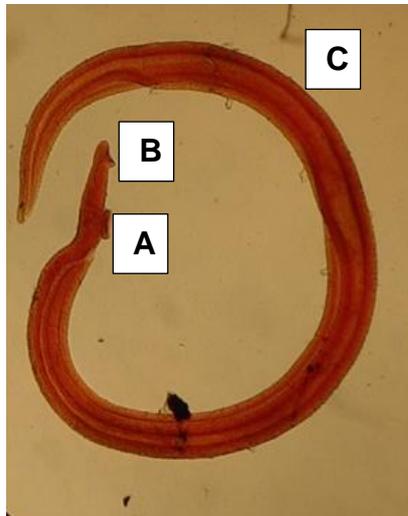
Fonte: Do autor.

Figura 11 - **A)** Canal ginecóforo do verme macho albergando o verme fêmea. **B)** Detalhe da fenda longitudinal do macho com a fêmea interiorizada.



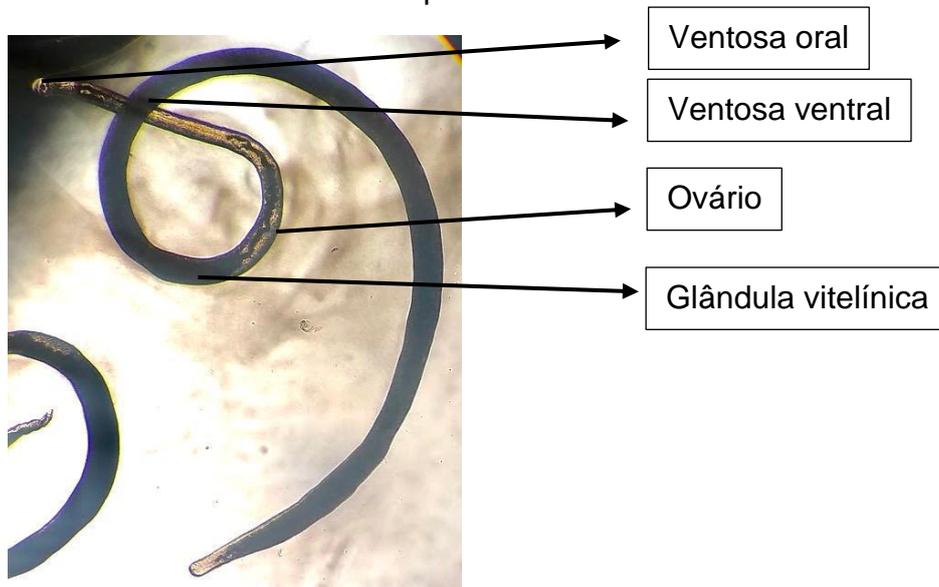
Fonte: Natural History Museum, London, 2018.

Figura 12 - Verme adulto macho totalmente maturado apresentando a ventosa ventral (A) e ventosa oral (B) bem definidas e canal ginecóforo (C).



Fonte: Universidade do Panamá

Figura 13 - Verme adulto fêmea, corpo cilíndrico apresentando estruturas apontadas nas setas.



Fonte: Do Autor.

A morfologia dos vermes adultos já foi descrita há mais de um século no Brasil (PIRAJÁ DA SILVA, 1908). O tegumento do macho (Figuras 11 e 12) é esbranquiçado, seu comprimento total é de mais ou menos 1cm. Anteriormente encontram-se as ventosas oral e ventral, espinhos e papilas sensoriais compostas por músculos não somáticos, como mostra a Figura 11 (MAIR et al., 1998).

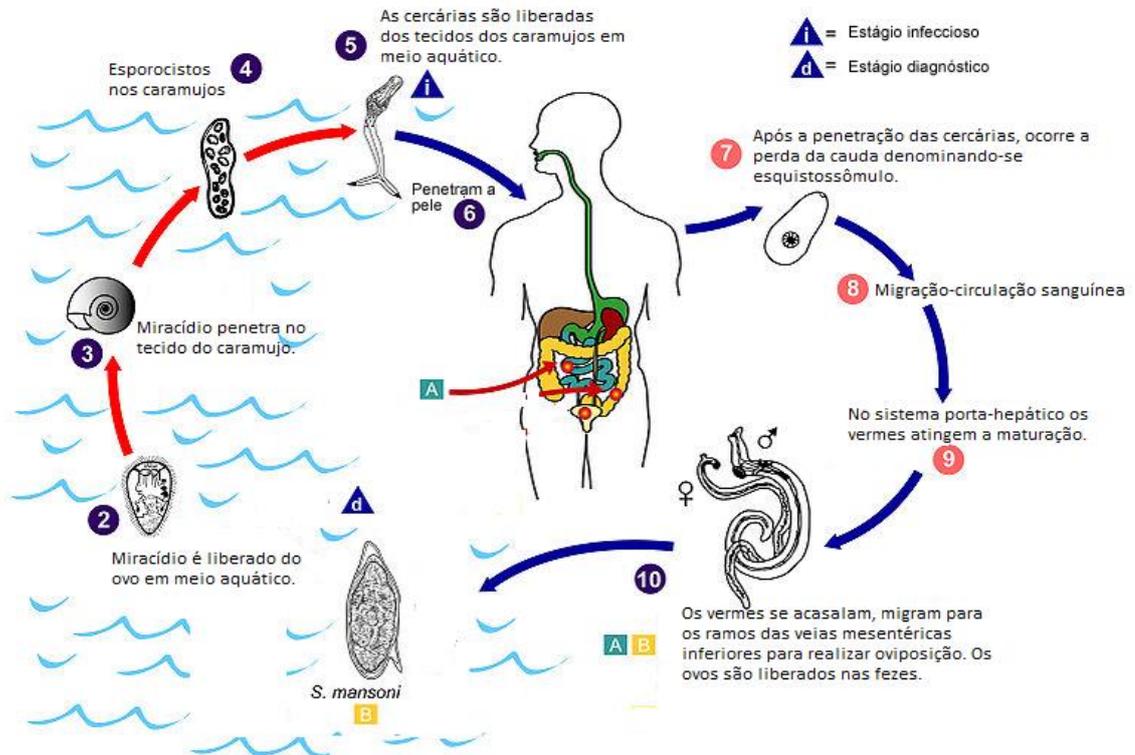
O sistema reprodutor masculino localiza-se ventralmente, diferenciando-se pela espessura do poro genital na porção inicial do canal ginecóforo. O líquido seminal é produzido pela vesícula seminal e conduzido pelo canal deferente até o canal ginecóforo, onde a fêmea será banhada pelo sêmen, no momento da copulação. Os ductos excretores são originados através dos túbulos coletores e formam uma bexiga que se conecta ao poro excretor (MACHADO-SILVA et al., 2003; MARTINEZ, 2003).

A fêmea adulta (Figura 13) é maior que o macho, medindo 1,5cm aproximadamente. Possui corpo cilíndrico, assim como ventosa ventral, também denominada de acetábulo, e ventosa oral, igualmente ao verme adulto macho, porém em tamanhos relativamente inferiores. Seu tegumento diverge do tegumento do macho por ser liso e translúcido, permitindo em microscopia óptica a visualização da hemozoína em coloração amarronzada, fruto do metabolismo eritrocitário feito pelos vermes. Não há diferenças descritas entre o sistema digestivo entre vermes machos e fêmeas. A fêmea possui a maior parte do corpo ocupada por glândulas vitelínicas que vão participar ativamente na formação da casca do ovo. O sistema reprodutor inicia logo abaixo do acetábulo, na vulva, seguido por estruturas como útero, ootipo e ovário. O ootipo ainda participa indiretamente da formação da casca do ovo como estimulador das células vitelínicas (CARVALHO et al., 2008; PEREIRA et al., 2013).

2.2.2 Ciclo Biológico

Para sua sobrevivência e perpetuação da espécie, *Schistosoma mansoni* desenvolve um ciclo biológico digenético (Figura 14) requerendo dois hospedeiros para completá-lo. No hospedeiro definitivo ocorre a reprodução sexuada pelos vermes adultos macho e fêmea, podendo ocorrer no homem ou alguns animais. No hospedeiro intermediário ocorre a reprodução assexuada apenas em caramujos do gênero *Biomphalaria* (Figura 15) que, apesar de todas as espécies deste gênero serem potenciais hospedeiros, apenas em algumas foi desenvolvida a adaptação necessária, ao longo do tempo, para uma compatibilidade favorável ao *S. mansoni* (CARVALHO et al., 2008).

Figura 14 - Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Adaptado de dpd.cdc.gov, 2012.

Figura 15 - Caramujos planorbídeos do gênero *Biomphalaria*. A) *Biomphalaria gabrata* in natura. B) Carcaças de caramujos do gênero *Biomphalaria*.



Fonte: Do Autor (A). en.wikipedia.org (B) acessado em 04/01/2020.

No ciclo evolutivo, o *S. mansoni* se apresenta em formas de vida livre e parasitária, sendo as formas de vida livre (miracídio e cercária) infectantes ao caramujo e ao homem, respectivamente. Um indivíduo infectado libera ovos viáveis

em suas fezes. Dentro do ovo encontra-se a larva aquática de vida livre, o miracídio, infectante ao caramujo, hospedeiro intermediário. Estando os ovos em meio aquático e expostos a luminosidade, temperatura entre 28-30°C, e oxigenação desencadeia-se a eclosão do miracídio (BARBOSA et al., 2000).

Através de mecanismos de reconhecimento químico, o miracídio é guiado ao encontro do caramujo através de gradientes de partículas presentes no muco do molusco. Movimentos contráteis e giratórios do miracídio somados a substâncias proteolíticas e à ação do *terebratorium* como uma ventosa, garantem a penetração da larva no caramujo. A penetração ocorre pelas partes moles do *Biomphalaria* e dura de 3 a 15 minutos (NEVES, 2016; LIBERATOS, 1987).

Com a penetração no caramujo o miracídio finaliza o processo de reestruturação se desfazendo de sua camada ciliada e demais componentes externos, passando a apresentar-se como um saco alongado. Esta estrutura sacular, denominada esporocisto I (primário ou mãe) alberga células germinativas que se diferenciarão em esporocistos secundários por um processo de poliembrionia e ao alcançarem as glândulas digestivas do caramujo se transformarão em cercárias. Cada miracídio, em média, gera de 100 mil a 300 mil cercárias do mesmo sexo. Esta parte do ciclo no hospedeiro intermediário ocorre em um período de aproximadamente trinta dias (BOYLE et al., 2003; GRYSSELS et al., 2006).

As cercárias maturam-se dentro de sacos germinativos a medida que o desenvolvimento vai sendo concluído. A liberação das cercárias é induzida por estímulos ambientais, como luz e temperatura. Para alcançarem o meio externo, as cercárias migram através de formações vesiculares que facilitando a passagem pelos tecidos do caramujo. Acredita-se que as cercárias possuam glândulas de escape que auxiliam na fase de emergência cercariana (COELHO e BEZERRA, 2006).

Liberadas na água, as cercárias nadam ativamente através da contração de sua musculatura a procura do hospedeiro definitivo. Enquanto livre, a cercária sobrevive em média de 24 a 36 horas, tendo uma maior viabilidade nas primeiras 8 horas após a liberação. Sinais químicos, térmicos e mecânicos aumentam a probabilidade das cercárias alcançarem o hospedeiro definitivo. Durante a

penetração na pele, o corpo cercariano usa mecanismos fisiológicos para liberação de enzimas proteolíticas. Uma vez interiorizado o corpo cercariano é denominado esquistossômulo e necessita atravessar várias camadas que compõem a pele (KIERSZENBAUM, 2002).

Nas primeiras horas, o esquistossômulo de pele passa por mudanças químicas e fisiológicas cruciais refletindo o processo de adaptação em um novo ambiente. Os vermes passam a sobreviver através de um metabolismo anaeróbio facultativo, sendo anteriormente um metabolismo oxidativo. Para escapar das respostas imunológicas do hospedeiro, o *S. mansoni* usa sua membrana heptalaminada que se prende às proteínas do plasma do hospedeiro, enganando o sistema imune e garantindo sua permanência no organismo por anos. Após alcançarem a corrente circulatória, uma semana após a infecção, os vermes caem na pequena circulação e migram para os pulmões, onde são conhecidos como esquistossômulos pulmonares. Neste local, o verme fica mais alongado e fino (MCLAREN, 1980; SKELLY e WILSON, 2006).

Após um breve período nos pulmões, o verme migra para os vasos hepáticos onde ficará totalmente maturo. Até chegar no sistema porta-hepático precisa ultrapassar algumas barreiras biológicas. Durante a migração os vermes conseguem alcançar o sistema porta-hepático através da via intravascular direta com recirculação. Acredita-se que nesta via o verme seja arrastado nas veias pulmonares até as câmaras esquerdas do coração, a partir daí, levados na grande circulação até o sistema porta-hepático. (CARVALHO et al., 2008). Da aorta até o sistema hepático, acredita-se que os vermes migrem pelos capilares sistêmicos, retornem à circulação venosa, para que só assim cheguem, de fato, à circulação portal (WILSON, 2009).

Ao chegarem nos vasos hepáticos, o verme conclui o processo de maturação do décimo ao vigésimo dia após a infecção. Nesta etapa, os vermes já metabolizam hemácias como fonte de nutrientes e morfologicamente já possuem um aumento considerável de tamanho. Após 21 dias, os vermes começam a acasalar, e migram através dos vasos mesentéricos para a intimidade da parede intestinal onde, por volta do 30^o-35^o dia de infecção, dão início ao processo de oviposição (WHEATHER E WILSON, 1979).

Os ovos recém produzidos não possuem miracídio ainda. São ovipostos enfileirados onde, até atravessarem a parede intestinal e alcançarem o lúmen, vão maturando do primeiro estágio ao ovo maduro durante um período de pelo menos seis dias. A fase de diagnóstico coproparasitológico, quando os ovos já podem ser detectados nas fezes, inicia por volta do 45º dia após a infecção. Os ovos levados junto ao bolo fecal, alcançarão o ambiente e darão continuidade ao ciclo, caso encontrem as condições descritas anteriormente. Permanecem viáveis no ambiente por até 5 dias, caso permaneçam em lugares com umidade suficiente, sendo levados em seguida para coleções hídricas (BRASIL, 2014).

2.2.3 Patogenia

O desenvolvimento da esquistossomose é complexo por envolver vários tipos de resposta imunológica, pela passagem do parasito em várias partes do corpo e pelas várias formas evolutivas apresentadas após a infecção enquanto o *S. mansoni* se desenvolve. De modo abrangente, a doença pode se apresentar em duas fases: aguda e crônica. Em áreas endêmicas, as infecções podem apresentar-se de forma assintomática, como também evoluir para um quadro hepatointestinal. A maioria dos óbitos concentra-se na fase crônica, onde é caracterizada pelas megalias e morbidade (NEVES, 2016).

A fase aguda engloba os sintomas iniciais que, por muitas vezes, são inespecíficos. Inicia-se desde o primeiro contato com o verme na forma de cercária, ocasionando uma reação inflamatória local denominada dermatite cercariana. Esta erupção cutânea é responsável por eliminar uma parte da carga parasitária, mas sem sucesso em relação a impedir o desenvolvimento do verme no organismo. Esta reação local é responsável ainda por uma linfadenite localizada, com aumento dos linfonodos para recrutamento de células imunológicas nesta primeira linha de defesa. Ainda pode apresentar de modo tardio angioedema ou urticária, durando até 12 semanas. A fase aguda perdura até 120 dias, mais ou menos, e causa febre, cefaleia, alergias, eosinofilia, diarreia, colites, hepatoesplenomegalias discretas e o início da reação granulomatosa. Ainda apresentando hipersensibilidade que ocorre entre 14-84 dias após a infecção, causada pela migração dos esquistossômulos ou dos ovos no organismo (ROSS et al., 2002; NEVES, 2016).

Com a persistência do patógeno e acúmulo de lesões, por volta do 120º dia após a infecção primária, inicia-se a fase caracterizada como crônica. O grande vilão e causador das complicações mais severas na esquistossomose é o ovo de *S. mansoni*. O miracídio que se alberga dentro do ovo é extremamente antigênico e libera grandes quantidades de SEA (Antígeno solúvel do ovo) que atravessam a casca porosa do ovo e sensibilizam o sistema imunológico. A resposta inflamatória resulta na formação de uma barreira de contenção biológica ao redor do patógeno, como um “plano B”, visto que o ovo é grande demais para ser fagocitado. Esta barreira consiste em um aglomerado de células denominada granuloma que, ao final do processo cicatricial, acarreta em perda de função da região acometida. No intestino, a intensa passagem de ovos para a luz intestinal causa diarreias mucossanguinolenta, dores abdominais, pseudotumores e perda do peristaltismo (ROSS et al., 2007).

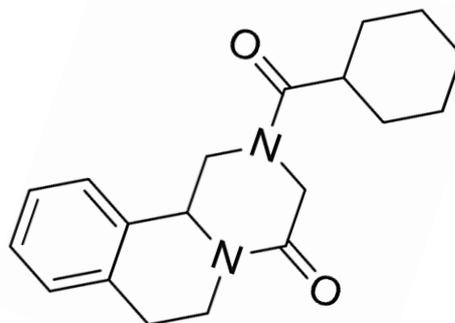
Com a sensibilização do sistema imunológico já se nota uma discreta megalia do baço, pelo aumento da demanda de células de defesa. Na fase crônica a alteração da arquitetura dos órgãos se dá pelo aumento do tamanho do órgão acometido devido a exacerbada formação granulomatosa, numa tentativa compensatória de manter as funções orgânicas normais. Com a hepatomegalia há um aumento da pressão portal, neste aumento de tamanho, o fígado perde a sua coloração natural e a definição linear de suas bordas, a cápsula de Glisson é retraída, conferindo-lhe um aspecto de casco de tartaruga, a fibrose de Symmers. A hipertensão portal é consequente dessas alterações teciduais que obstruem os vasos sanguíneos, acarretando numa congestão sanguínea. O organismo encontra três formas de compensação: formação de uma circulação colateral para passagem de sangue (varizes), compartilhamento de parte desse sangue congestionado com o baço, fazendo ele aumentar de tamanho (hepatoesplenomegalia) ou ainda extravasamento da parte líquida do sangue, desembocando na cavidade peritoneal (ascite), caracterizando a barriga d’água. Estas alterações podem ser, e são por muitas vezes, de decorrência concomitante, sendo mais frequentes registros de óbitos em pacientes com este grau de acometimento (ROSS et al., 2002; ROSS et al., 2007).

2.2.4 Tratamento

Uma doença de desenvolvimento complexo, como a esquistossomose, exige profundos estudos para desenvolver um fármaco, o qual deverá eliminar a carga parasitária e reverter as alterações causadas pelo parasito. Desde a década de 1920 a busca por drogas eficazes contra a esquistossomose instiga a ciência, compostos derivados dos sais de antimônio e o lucantone utilizados nessa época foram descartados por causa de seus efeitos colaterais (NOVAES et al., 1999). Outro fármaco com efeitos colaterais menos prejudiciais, surgiu na década de 1970, destacando-se por sua eficácia contra vermes machos adultos de *S. mansoni*, o oxaminiquine. Porém este fármaco era apenas eficaz contra a espécie *Schistosoma mansoni*, o que foi um determinante para sua extinção do comércio farmacêutico quando surgiu o praziquantel (PZQ), que é eficaz contra todas as espécies do gênero *Schistosoma* e é utilizada até os dias atuais (FERREIRA et al., 2003).

O PZQ (Figura 16) é um derivado da pirazinoisoquinolona, composto quiral de baixa hidrossolubilidade. Inicialmente planejado para uso em animais como alternativa para o tratamento da teníase (*Taenia sp.*). Foi descrito há quase meio século, destacando-se por ser bem tolerado em doses terapêuticas, eficaz e de baixa toxicidade. Por atender aos pré-requisitos da Organização Mundial de Saúde (OMS), na década de 80 passou a ser utilizado em humanos como fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose e cestódeos (WILSON, 2009; SILVA et al., 2017).

Figura 16 - Estrutura molecular do Praziquantel. (RS)-2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11 b-hexahidro-4H-pirazino-4-ona



Fonte: SILVA et al. 2017.

Possui ação esquistossomicida limitada a vermes adultos, possui baixa eficácia contra vermes jovens nas concentrações terapêuticas, sem razões descritas para tal fato (CIOLI, 2014). O PZQ causa contrações espásticas na musculatura do verme. É bem descrita a importância dos canais de cálcio dependentes de voltagem, já que estes sob a ação do PZQ alteram as concentrações de cálcio intracelular, interferindo na liberação de neurotransmissores, na contração muscular do verme e até na expressão de genes. Embora haja credibilidade nesta hipótese, não há um mecanismo bem elucidado para a ação do praziquantel (GREENBERG, 2006; SALVADOR-RECATALA et al., 2008).

Sabe-se que uma doença torna-se considerada como negligenciada quando não se produz novos medicamentos em um intervalo de 30 anos. O praziquantel foi liberado para administração em humanos há 40 anos, desde então é o único fármaco disponível para o tratamento da esquistossomose. A utilização de um mesmo fármaco por tanto tempo, somado ao uso indiscriminado ou de modo irresponsável, como nos tratamentos em massa, potencializa a possibilidade do aparecimento de cepas resistentes à droga (SABRA & BOTROS, 2008; WANG, 2012).

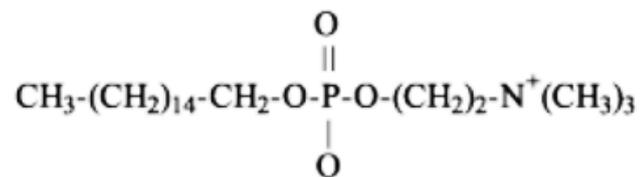
Laboratorialmente há registros de cepas resistentes provenientes de alguns casos isolados no Egito, onde foram encontrados ovos de *S. mansoni* viáveis em fezes de indivíduos após o tratamento com o praziquantel (SMALL et al., 1999). Regiões endêmicas, onde há constantes reinfecções, faz-se necessário o uso do PZQ repetidas vezes, também elevando a probabilidade de aparecimento de cepas resistentes (DOENHOFF et al., 2009). Os países africanos lideram em quantidade de casos registrados cepas isoladas que apresentam resistência ou forte tolerância ao uso do PZQ. A administração contínua da droga foi apontada como uma forte causa de tolerância, representada pelo aumento da Dose de Efeito para 50% (ED₅₀) da população de vermes adultos em cepas submetidas a tratamentos anteriores comparados a grupos não tratados anteriormente (COUTO, 2011).

Diante de tudo isso, o uso racional do praziquantel é a saída mais coerente no sentido de evitar possível surgimento de cepas resistentes. Seja a preservação pela substituição total por outra droga de igual ou melhor efeito, ou pela substituição parcial, diminuindo a exposição do indivíduo à droga.

2.2.5 Miltefosina

Desenvolvida na década de 90, a miltefosina é um fármaco da classe dos antineoplásicos, é uma hexadecilfosfocolina derivada de alquilfosfolipídio (EIBL e UNGER, 1990). Desde então a miltefosina (MTF) vem demonstrando, em estudos científicos, atividade contra linhagens celulares cancerígenas e tumores sólidos, no tratamento de tumores mamários metastáticos na pele (HILGARD et al., 1993; BLITTERSWIJK e VERHEIJ, 2008). Anos depois a MTF (Figura 17) demonstrou ser eficaz no tratamento de todas as formas de leishmanioses, vindo a se tornar o primeiro fármaco aprovado para tratamento oral da doença (SINDERMANN et al., 2004).

Figura 17 - Fórmula estrutural da Miltefosina (MTF).



Fonte: RATH et al., 2003.

Diante de estudos realizados com a miltefosina foi verificada atividade contra protozooses humanas, como as causadas pela *Entamoeba histolytica*, *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei*, além de atividade contra algumas espécies bacterianas e fúngicas (LIRA et al., 2001; WALOCHNIK et al., 2002; LLULL et al., 2007). O mecanismo de ação da MTF nas leishmanioses permanece pouco elucidado, acredita-se na participação da enzima citocromo C oxidase como um potencial alvo terapêutico intracelular. Por outro lado, o mecanismo antineoplásico da droga é bem descrito e sabe-se que a MTF atua no metabolismo intracelular do colesterol, bem como interferindo no equilíbrio fosfolipídico da célula (JIMÉNEZ-LOPES, 2010).

Estudos apontam a MTF como um potencial esquistossomicida *in vitro* contra vermes adultos de *S. mansoni*, induzindo a apoptose celular, causando danos severos ao tegumento do verme. Esse mesmo estudo a miltefosina é descrita como

a agente de uma paralisia no verme, sem causar contrações como as que são observadas com o PZQ. A exposição do verme ao fármaco causa lesões progressivas em seu tegumento heptalaminar, fundamental para um dos mais importantes mecanismos de escape de *Schistosoma mansoni*, impedindo-o de ligar-se a proteínas do hospedeiro para mascarar-se diante do sistema imunológico. Foram descritas lesões do tipo bolhas, orifícios, descamação do tegumento, redução e desgaste dos espinhos e consequente morte do parasito. Concluiu-se assim que as bicamadas lipídicas que compõem o tegumento do verme constituem o alvo terapêutico mais importante da MTF (BERTÃO et al., 2012).

A miltefosina ainda apresenta eficácia contra outra espécie do gênero *Schistosoma*, *Schistosoma haematobium*, sendo ativa contra estágios larvais do verme e ainda mais potente no combate a vermes adultos de *S. haematobium*, embora tenha alcançado efeitos consideráveis em ambas as espécies (EISSA et al., 2011).

Também demonstra eficácia contra *S. mansoni* em testes *in vivo*. Esta alquilfosfocolina demonstrou em estudos importante diminuição da carga parasitária em camundongos infectados e submetidos à intervenção terapêutica no primeiro dia de infecção, em vermes jovens (sendo a intervenção aos 21 dias após a infecção) e em vermes adultos (sendo a intervenção aos 42 dias após a infecção). Outros parâmetros avaliados no mesmo estudo, em diferentes estágios evolutivos do verme, corroboram a potencial inclusão da MTF como tratamento alternativo da esquistossomose humana. Demonstrou considerável redução no diâmetro dos granulomas nos diferentes estágios evolutivos testados, refletindo numa maior preservação da atividade hepática, quando administrada numa concentração de 20mg/kg por 5 dias consecutivos (EISSA et al., 2015).

Desta forma, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, a miltefosina é cogitada como uma importante alternativa esquistossomicida por suas atividades lesivas ao tegumento do verme, levando-o à morte mesmo sem uma total elucidação de seus mecanismos de ação.

2.2.6 Associação de fármacos: Aplicações e finalidades

A utilização de monoterapia apresenta, a longo prazo, riscos à eficácia da droga. A utilização de uma associação farmacológica como alternativa ao tratamento monoterápico já é uma realidade em diversos quadros infecciosos por microrganismos. É possível encontrar associações farmacológicas como solução para quadros de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina, infecções pelo HIV ou ainda quimioterapias contra o câncer (LUMA et al., 2010; MS, 2010).

Por muitas vezes, para atingir o efeito desejado, faz-se necessária a utilização de uma elevada dose de ataque de uma determinada droga em questão, podendo levar o indivíduo a um quadro tóxico. A associação sinérgica entre duas ou mais drogas pode diminuir esse risco por apresentar um melhor efeito, mesmo com uma dose menor, comparada a doses de drogas isoladas. Desta forma, além de reduzir efeitos tóxicos, eliminam a possibilidade de resistência por apresentarem rápido efeito e preservarem a droga de ser exposta excessivamente (LÈHAR et al., 2009).

Três formas interativas entre fármacos são bem conhecidas, a depender de sua estrutura química e dos respectivos mecanismos de ação, podendo apresentar efeito aditivo quando o efeito final das dois fármacos é igual à soma dos efeitos isolados, antagônico quando as drogas interagem diminuindo ou anulando o efeito uma da outra, comparado ao efeito isolado delas e finalmente podendo apresentar efeito sinérgico quando a associação de drogas possui efeito final maior do que o efeito que as drogas utilizadas teriam isoladamente, sendo as mesmas utilizadas em menor concentração quando associadas. Para determinar o tipo de interação em questão, utiliza-se o teorema do Índice de Combinação (IC ou CI, do inglês Combination Index) de Paul Talalay e Ting-Chao Chou. Este teorema indica o tipo de interação por meio de valores padronizados internacionalmente. Quando o $IC < 1$ o efeito da combinação de drogas é sinérgico, $IC > 1$ indica efeito antagônico e, por fim, $IC = 1$ indica um efeito aditivo. Este cálculo pode ser feito de modo automatizado por meio de softwares específicos (CHOU, 2010).

Quando duas ou mais drogas atuam por meio de distintos mecanismos para uma mesma finalidade em uma determinada doença, provavelmente resulta em efeito sinérgico. Se houver atuação em um mesmo receptor por mais de uma

substância sem competição, o efeito final expresso é aditivo. Enquanto que uma competição de diferentes drogas pelo mesmo receptor reflete em efeito antagônico, inibindo o efeito de uma das substâncias em questão (GOLAN, 2009).

Como explanado anteriormente, o PZQ tem sido por muitos anos, até a presente data, o único fármaco eficaz utilizado no tratamento da esquistossomose. Isto, por si só, é um fator alarmante. Uma alternativa que vem sendo estudada no tratamento desta doença é a associação de drogas com o PZQ, numa tentativa de minimizar a exposição desta droga e atenuar cada vez mais as possíveis resistências de cepas do gênero *Schistosoma*. Alguns estudos apontam resultados promissores de fármacos bem conhecidos e biosseguros aliados em associação com o PZQ, como é o caso da lovastatina (inibidora da síntese de colesterol) e do clonazepan (inibidor do sistema nervoso central). Ou ainda, frente à cepa LE de *S. mansoni*, uma potencial ação sinérgica entre o praziquantel e o omeprazol (inibidor da bomba de H⁺) *in vitro*. Resultados promissores norteiam um novo caminho para o controle e, talvez, a erradicação da doença (ARAUJO et al., 2008; ALMEIDA et al., 2015; SANTOS, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar atividade esquistossomicida, *in vitro*, da Miltefosina (MTF) isolada e em associação com Praziquantel (PZQ) sobre *Schistosoma mansoni* (cepa BH).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as concentrações letais médias (CL₅₀) da MTF e PZQ;
- Determinar a atividade esquistossomicida da MTF e PZQ frente à esquistossômulos, vermes jovens e vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (cepa BH);
- Avaliar a atividade esquistossomicida das associações na concentração equivalente a CL₅₀ e inferiores da MTF+PZQ sobre esquistossômulos, vermes jovens e vermes adultos;
- Avaliar a capacidade inibitória da associação MTF+PZQ frente a atividade ovipositora de casais de *Schistosoma mansoni* (cepa BH).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Toda a parte experimental foi iniciada após a devida autorização dada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco-UFPE, sob o processo de número 23076.011235/2018-86.

Para os experimentos foram utilizados 60 camundongos fêmeas, *Swiss (Mus musculus)*, pesando 30 - 35g, com 30 dias de idade, fornecidos e mantidos no biotério do laboratório de Imunopatologia Keizo Asami - LIKA, recebendo água e ração *ad libitum*, à temperatura ambiente de 25°C e fotoperíodo de 12 horas de claro e 12 horas de escuro.

Foi utilizada a cepa (BH) de *Schistosoma mansoni*, originária de Belo Horizonte – Minas Gerais, mantida no moluscário da Disciplina de Parasitologia, da área Acadêmica de Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da UFPE, através de passagens sucessivas do parasito em caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* e camundongos *Swiss* fêmea.

4.2 COMPOSTOS

O praziquantel (RS) (2-(ciclohexilcarbonil) -1,2,3,6,7-11β-hexahidro-4H pirazino (2,1a) isoquinolin-4-ona) (MM = 312,4061 g/mol), lote 122K1443 e a Miltefosina (2 - [[(Hexadecyloxy) hydroxyphosphinyl]oxy] - N,N,N - trimethylethanaminium) (MM = 407,57g/mol), lote SLBW8818 foram adquiridos do laboratório Sigma Aldrich Corporation.

4.3 INFECÇÃO DE CARAMUJOS, OBTENÇÃO DE CERCÁRIAS E INFECÇÃO DE CAMUNDONGOS COM CERCARIAS DE *Schistosoma mansoni* (CEPA BH)

Foram coletadas fezes de camundongos infectados com cercarias de *Schistosoma mansoni* e processadas para a realização do método de sedimentação espontânea (Método de Hoffmann). Após sucessivas lavagens do material fecal, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi transferido para placas de Petri e exposto à luz artificial por um período de 30 a 60 minutos a fim de ocorrer a eclosão dos miracidios. Cada caramujo *Biomphalaria glabrata* foi exposto com 5-7 miracidios por no mínimo 2h. Após a infecção, os moluscos foram agrupados em aquário de acordo com a data de infecção e mantidos ao abrigo da luz (STANDEN, 1952). Após trinta dias da infecção os caramujos foram expostos a luz artificial, durante 1h, para a obtenção da suspensão cercariana.

Para infecção dos camundongos com cercarias de *S. mansoni* os animais foram previamente anestesiados, utilizando uma combinação de Xilasina e Ketamina e em seguida submetidos à exposição de uma alíquota da suspensão cercariana contendo 120 cercárias, por via per cutânea e por um período de 30 minutos. Finalizado o processo de infecção, os camundongos foram realojados em suas gaiolas e devolvidos às condições de manutenção já estabelecidas.

4.4 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DOS ESQUISTOSSÔMULOS DE 3 HORAS FRENTE A MILTEFOSINA E PRAZIQUANTEL

Para a obtenção de cercarias, foi repetido o processo de exposição dos caramujos à luz descrito no tópico anterior.

Para a obtenção de esquistossômulos, uma suspensão cercariana obtida de caramujos expostos à luz artificial foi submetida à agitação turbulenta e pressurização aumentada, conforme Ramalho-Pinto (1974). Os esquistossômulos obtidos foram devidamente lavados em meio RPMI-1640 contendo HEPES 20mM pH = 7,5, suplementado com soro bovino fetal a 10% e acrescido com penicilina (100UI/mL) e estreptomicina (100µg/mL). Após a lavagem, os esquistossômulos

foram transferidos para placas de 24 poços, numa média de 50 vermes por poço, contendo o mesmo meio e incubados em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

Após um período de 3h, foram adicionadas as drogas em concentrações variando de 12,5 a 300µM tanto para a MTF quanto para o PZQ. As placas foram novamente incubadas e após o intervalo de 3h, 6h, 12h e 24h os vermes foram avaliados.

4.5 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DE VERMES JOVENS, COM 21 DIAS, FRENTE À MILTEFOSINA E PRAZQUANTEL

Após 21 dias de infecção dos camundongos com cercarias de *S. mansoni*, vermes jovens foram recuperados por perfusão de solução fisiológica através da veia porta e imediatamente postos em contato com o meio RPMI-1640 contendo HEPES 20mM pH = 7,5 e suplementado com soro bovino fetal a 10%, penicilina (100UI/ml) e estreptomicina (100µg/mL). Em seguida foram arranjados em placas estéreis de 24 poços com, em média, 12 vermes por poço com o mesmo meio e incubados em estufa a 37°C em atmosfera úmida 5% de CO₂.

Os vermes jovens permaneceram incubados na estufa respeitando o tempo de 2 horas para adaptação ao meio. Em seguida, MTF e PZQ foram adicionados ao meio nas concentrações de 200, 150, 100, 75, 50, 25 e 12,5 µM. As placas foram novamente incubadas e após o intervalo de 3h, 6h, 12h e 24h os vermes foram avaliados.

4.6 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DE VERMES ADULTOS, COM 50 DIAS, FRENTE À MILTEFOSINA E PRAZQUANTEL

Aos 50 dias de infecção dos camundongos com cercarias de *S. mansoni*, vermes adultos foram recuperados por perfusão de solução fisiológica através da veia porta e vasos mesentéricos inferiores, e imediatamente postos em contato com o meio RPMI-1640 contendo HEPES 20mM pH = 7,5 e suplementado com soro bovino fetal a 10%, penicilina (100UI/ml) e estreptomicina (100µg/mL).

Casais de vermes foram separados e os vermes machos e fêmeas foram analisados separadamente. Os vermes foram distribuídos em placas estéreis de 24

poços (8 vermes por poço) e incubados em estufa, nas mesmas condições descritas para os vermes jovens, durante 2h para adaptação ao meio.

Com os vermes adaptados ao meio, foi adicionada a MTF em concentrações que variaram de 12,5 a 200 μ M, tanto para vermes machos quanto fêmeas. As concentrações de PZQ foram diferentes, variaram para macho e para fêmea entre 0,3125-5 μ M e 12,5-100 μ M, respectivamente. Em seguida, as placas foram novamente incubadas em estufa sob as mesmas condições descritas anteriormente. A avaliação foi realizada num período de 24h a partir do momento de exposição às drogas, sendo registradas as alterações ocorridas nos tempos 3h, 6h, 12h e 24h.

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA ASSOCIAÇÃO MTF/PZQ FRENTE ÀS DIFERENTES FASES EVOLUTIVAS DE *Schistosoma mansoni* (CEPA BH)

Para a realização dos testes de atividade esquistossomicida da associação MTF/PZQ foi necessário determinar a concentração letal 50% (CL₅₀) da Miltefosina e do Praziquantel frente às fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH) anteriormente utilizadas, esquistossômulos (3h), vermes jovens (21 dias), vermes adultos (50 dias) quando incubadas por um período de 24 horas. As LC₅₀ foram calculadas usando o software CompuSyn.

A atividade esquistossomicida da associação MTF/PZQ frente às diferentes fases de maturação do *S. mansoni* foi determinada a partir da utilização de diferentes concentrações de MTF e PZQ, variando desde a CL₅₀ até uma diluição de $\frac{1}{32}$ CL₅₀ (0,03125CL₅₀) de ambos. A associação MTF/PZQ foi introduzida de modo simultâneo em placas de 24 poços para uma avaliação de 24h nos intervalos de 3h, 6h, 12h e 24h. As placas foram incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂.

4.8 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE INIBITÓRIA DA ASSOCIAÇÃO MTF/PZQ FRENTE À OVIPOSIÇÃO DE FÊMEAS DE *Schistosoma mansoni* (CEPA BH) EM CÓPULA

Casais de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* foram recuperados de camundongos infectados no 50º dia após infecção e foram submetidos aos mesmos procedimentos anteriormente descritos.

As concentrações de MTF e PZQ utilizadas foram determinadas a partir das CL₅₀ obtidas nos ensaios de vermes adultos machos e fêmeas, uma vez que em cada poço foram depositados machos e fêmeas acasalados. Desta forma, dois experimentos foram montados, em um foram utilizadas as concentrações norteadas pela CL₅₀ para vermes machos e outra pela CL₅₀ para vermes fêmea.

As concentrações de cada droga na associação variaram entre a CL₅₀ até uma diluição de $\frac{1}{32}$ CL₅₀ (0,03125CL₅₀) da MTF e do PZQ, sendo selecionadas apenas concentrações subletais a partir dos testes anteriores para avaliação da capacidade inibitória da associação frente à oviposição dos casais de *Schistosoma mansoni*.

Todos os vermes estavam acasalados no momento da incubação e durante todo o experimento.

Os casais de vermes foram distribuídos em placas de 24 poços, 3 casais por poço, respeitando o tempo de adaptação ao meio RPMI 1640 de 2h sem exposição às drogas. Após a adição das drogas ao meio foi realizada a avaliação num período de 120h, em intervalos de 24h entre cada avaliação. Após 48h de exposição, os casais foram removidos para poços com meio de cultura livre de drogas e avaliados por mais 72h em intervalos de 24 horas.

4.9 CRITÉRIO DE AVALIAÇÃO

As avaliações foram realizadas com o auxílio de um microscópio invertido. Em todos os testes de 24h, as avaliações de contração muscular, lesões no tegumento e taxa de mortalidade foram realizadas em 3h, 6h, 12h e 24h a partir do momento de exposição do verme à droga. Foram considerados mortos todos os vermes que não

realizaram nenhum movimento durante 2 minutos de avaliação contínua (MANNECK *et al.*2010). O grau de motilidade foi estabelecido numa escala de 0-3. Sendo 3 para vermes com movimentação total do corpo, 2 para vermes com contrações parciais do corpo, 1 para vermes com movimentação apenas das ventosas e 0 para vermes mortos.

Os testes foram feitos em triplicata. Os controles negativos foram acrescidos apenas de DMSO a 1,6% ou apenas o meio sem qualquer adição.

As CL_{50} , índice de combinação (IC) e as representações gráficas foram realizadas usando o software CompuSyn. De acordo com Chou, será considerada uma atividade sinérgica entre as drogas se o IC for menor que 1, atividade aditiva entre as drogas se o IC for igual a 1 e atividade antagônica entre as drogas se o IC for maior que 1 (CHOU, 2006).

5 RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DE ESQUISTOSSÔMULOS COM 3 HORAS FRENTE A MILTEFOSINA E PRAZIQUANTEL

Durante 24h os esquistossômulos controles, sem exposição à miltefosina ou praziquantel, permaneceram com movimentações normais, aderiram ao fundo da placa através das ventosas e o tegumento permaneceu intacto (Score=3). Na tabela 1, estão denotadas em scores as alterações de motilidade dos esquistossômulos, *in vitro*, no intervalo de 24h, expostos à miltefosina.

Tabela 1 - Score de motilidade, expresso em percentagem, de esquistossômulos com 3 horas, controles e tratados com Miltefosina em 24h de incubação. n=50.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo MTF Esquistossômulo	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle Meio	100				100				100				100			
200µM	100				30	15	8	47			15	85				100
150µM	100				39	20	12	29		5	29	66			11	89
100µM	100				51	21	18	10		18	40	42		16	46	48
75µM	100				62	12	26		7	18	35	40	11	14	31	44
50µM	100				74	26			14	21	40	25	9	14	30	37
25µM	100				100				60	15	10	15	44	10	10	36
12,5µM	100				100				100				100			

LC₅₀: 53,86 µM

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

O efeito da miltefosina sobre os esquistossômulos de 3h demonstrou ser dependente do tempo de exposição e da concentração utilizada. Durante as três primeiras horas de exposição, não foi observado nenhum efeito significativo na motilidade dos vermes. Os efeitos passaram a ser notados a partir das 6h de exposição na concentração de 50µM. A partir desse tempo o efeito observado foi

dependente do tempo e da concentração utilizada. Nos intervalos de 12-24h com as três maiores concentrações todos os vermes mostraram alterações na motilidade. A

O efeito máximo, mortalidade de 100%, foi alcançado em 24h de exposição na concentração de 200 μ M.

Tabela 2 - Score de motilidade, expresso em percentagem, de esquistossômulos com 3 horas controles e tratados com PZQ em 24h de incubação. n=50.

Grupo PZQ Esquistos- sômulos	Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)															
	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle Meio	100				100				100				100			
350 μ M	100				100				100				16 84			
300 μ M	100				100				100				32 68			
250 μ M	100				100				100				34 66			
200 μ M	100				100				100				48 52			
150 μ M	100				100				100				64 36			
100 μ M	100				100				100				74 26			
LC ₅₀ : 173,89 μ M																

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

Quando esquistossômulos são expostos ao praziquantel o efeito espástico sobre a musculatura do verme é evidenciado logo de imediato. Na tabela 2 podemos observar que a motilidade dos vermes foi afetada logo nas três horas de exposição. Com o passar do tempo os vermes permaneceram sem movimento do corpo sendo observado apenas movimento das ventosas, os quais foram dependentes da concentração. A mortalidade de vermes foi evidenciada em 24 horas de exposição em todas as concentrações avaliadas, mas o efeito máximo (100%) não foi observado. Durante o intervalo de observação, foram observadas formações bolhosas no tegumento dos vermes, os mesmos permaneceram contraídos, dando a impressão de encolhimento e a coloração mudou para tons acastanhados mais escuros em relação ao grupo controle que permaneceu ativo e com uma coloração clara levemente translúcida.

5.2 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DE VERMES JOVENS COM 21 DIAS FRENTE A B-MILTEFOZINA E PRAZIQUANTEL

Vermes jovens sem exposição à miltefosina ou praziquantel permaneceram, durante todo o experimento (24h), com movimentações normais, aderiram-se ao fundo da placa através das ventosas e com tegumento intacto (Score=3).

Os vermes jovens apresentaram considerável susceptibilidade à miltefosina, em comparação às outras fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* e em comparação ao efeito do praziquantel.

Alterações na motilidade puderam ser observadas nas primeiras seis horas de exposição à MTF e esse efeito seguiu aumentando em função do tempo e da concentração. Ao final das 24h, o efeito máximo foi alcançado nas duas maiores concentrações. Também foram significativos os efeitos alcançados com as concentrações de 100 e 75 μM , cujas mortalidades foram de 98 e 88%, respectivamente (tabela 3). Exceto os vermes com classificação 3 no score, os vermes afetados pela exposição à droga apresentaram formações bolhosas, escurecimento do tegumento e comprometimento da contração da musculatura, variando o grau de acometimento de acordo com a relação tempo/concentração.

Tabela 3 - Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes jovens com 21 dias, controles e tratados com Miltefosina em 24h de incubação. n= 12.

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)

Grupo MTF Vermes Jovens	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle Meio	100				100				100				100			
200 μM	100				42	24	10	24		22	32	46				100
150 μM	100				44	28	8	20		28	36	36				100
100 μM	100				50	18	18	14	8	22	30	40			2	98
75 μM	100				36	28	26	10	6	18	44	32		2	10	88
50 μM	100				42	20	30	8	8	20	52	20		14	30	56
25 μM	100				100				95	3	2		80	10	2	8
12,5 μM	100				100				100				100			

LC50: 40,9 μM

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

Tabela 4 - Score de motilidade, expresso em percentagem de vermes jovens com 21 dias, controles e tratados com PZQ em 24h de incubação. n=12

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo PZQ Vermes Jovens	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle Meio	100				100				100				100			
200µM			100				100				100		12		88	
150µM			100				100				100		32		68	
100µM			100				100				100		40		60	
75µM			100				100				100		46		54	
50µM			100				100				100		99		1	
25µM			100				100				100		100			
12,5µM			100				100				100		100			
LC ₅₀ : 96,57µM																

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

O efeito espástico do PZQ sobre a musculatura do verme foi evidenciado desde as primeiras horas, mantendo o verme imóvel e encurtado com movimentação discreta apenas nas ventosas até as 12 h de exposição ao PZQ. Mortalidade de vermes foi registrada com 24 horas de observação, mas não foi alcançado o efeito máximo. Com a maior concentração a mortalidade foi de 88% (Tabela 4). O tegumento dos vermes, ao longo do tempo, apresentou formações bolhosas, algumas intactas e outras nitidamente rompidas, a coloração também apresentou alterações tornando-se escura.

5.3 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DOS VERMES ADULTOS MACHOS COM 50 DIAS FRENTE À MILTEFOSINA E PRAZIQUANTEL

Durante 24h os vermes adultos machos controles, sem exposição à miltefosina ou praziquantel, permaneceram com movimentações normais, aderiram-se ao fundo da placa através das ventosas e o tegumento permaneceu intacto (Score=3).

Os vermes adultos machos apresentaram uma relativa tolerância ao efeito da miltefosina.

Tabela 5 - Score de motilidade, expresso em percentagem de vermes adultos machos com 50 dias controles e tratados com Miltefosina livre em 24h de incubação. n=8

Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)																
Grupo MTF Machos	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle Meio	100				100				100				100			
200µM	100				62,5	37,5			50	50				12,5	87,5	
150µM	100				50	50			62,5	37,5				37,5	62,5	
100µM	100				100				75	25				45	46	12,5
75µM	100				100				100				87,5	12,5		
50µM	100				100				100				100			
25µM	100				100				100				100			
12,5µM	100				100				100				100			

LC50: 187,7µM

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

Nesta fase evolutiva de *Schistosoma mansoni* somente as maiores concentrações, 200µM e 150µM, interferiram na motilidade dos vermes no tempo de observação de 6 horas. Nesse período também foi observado alterações no tegumento dos vermes com pequenas formações bolhosas. Com o passar do tempo o efeito sobre a motilidade e o tegumento tornou-se mais evidente e concentrações menores também passaram a apresentar efeito, embora só tenha apresentado índices de mortalidade na avaliação de 24h. Apenas as três maiores concentrações, 200µM, 150µM e 100µM, apresentaram mortalidade com taxas de 95%, 58% e 9%, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 6 - Score de motilidade, expresso em percentagem de vermes adultos machos com 50 dias, controles e tratados com praziquantel e em 24h de incubação. n=8

Grupo PZQ Macho	Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)															
	3 h				6 h				12 h				24 h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle Meio	100				100				100				100			
5 μ M	100				37,5	62,5			37,5	62,5			25	75		
2.5 μ M	100				75	25			62,5	37,5			50	50		
1.25 μ M	100				100				100				87,5	12,5		
0.625 μ M	100				100				100							
0.3125 μ M	100				100				100							
LC50: 2,92 μ M																

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

Os vermes adultos machos possuem uma susceptibilidade consideravelmente maior ao PZQ do que comparada à MTF, os valores expressos das concentrações e das respectivas mortalidades relatam essa sensibilidade (tabela 6). Como nas outras fases evolutivas expostas ao praziquantel, de início é possível observar o efeito da droga sobre o peristaltismo dos vermes, a droga consegue paralisar a musculatura em pouco tempo. Apesar das baixíssimas concentrações utilizadas, a partir das 6h de exposição já são observados índices de mortalidade nas maiores concentrações utilizadas. As duas menores concentrações não apresentaram taxas de mortalidade, porém apresentaram comprometimento da motilidade em graus elevados, apenas havendo movimentação das ventosas dos vermes.

5.4 AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE *IN VITRO* DOS VERMES ADULTOS FÊMEAS COM 50 DIAS FRENTE À MILTEFOSINA E PRAZIQUANTEL

Durante 24h os vermes adultos fêmeas controles, sem exposição à miltefosina ou praziquantel, permaneceram com movimentações normais, aderiram-se ao fundo da placa através das ventosas e o tegumento permaneceu intacto (Score=3).

Os vermes adultos fêmeas apresentaram uma rápida resposta à exposição da miltefosina. Nas primeiras 3h de avaliação, é possível observar importantes alterações de motilidade (tabela 7) e tegumentares ao longo do corpo do verme. Formações bolhosas consideráveis pelo corpo e pela região das ventosas.

Tabela 7 - Score de motilidade, expresso em porcentagem, de vermes adultos fêmeas com 50 dias, controles e tratados com miltefosina em 24h de incubação. n=8

Grupo MTF Fêmeas	Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)															
	3 h				6h				12h				24h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle Meio	100				100				100				100			
200µM	62.5	37.5			50	12.5	25	12.5					100			100
150µM	50	50			62.5	37.5				50	50				12.5	87.5
100µM	87.5	12.5			62.5	37.5				62.5	37.5			12.5	37.5	50
75µM	100				87.5	12.5			12.5	87.5			25	37.5	25	12,5
50µM	100				100				100				50	25	25	
25µM	100				100				100				75	25		
12,5µM	100				100				100				87.5	12.5		

LC50: 108.6 µM

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

As três maiores concentrações utilizadas mostraram comprometimento da motilidade já nas três primeiras horas. Após 6h, pode-se observar mortalidade com a maior concentração, 200µM, enquanto as concentrações de 150µM, 100µM e 75µM apresentam consideráveis alterações devido a essa exposição. Após 12h todos os vermes expostos à concentração de 200µM estavam mortos, enquanto gradativamente as lesões das demais concentrações aumentavam. Decorridas 24h de exposição, as quatro maiores concentrações apresentaram taxas de mortalidade, variando de 12,5% a 100%. Os vermes que restaram vivos apresentaram importantes lesões no tegumento, aparentemente enrugados na microscopia, coloração escurecida e corpo rígido.

Tabela 8 - Score de motilidade, expresso em percentagem, de vermes adultos fêmeas com 50 dias controles e tratados com praziquantel em 24h de incubação. n=8

Grupo PZQ Fêmea	Motilidade em scores dos vermes após incubação (%)															
	3 h				6 h				12 h				24 h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
Controle Meio	100				100				100				100			
100µM	100				87.5 12.5				87.5 12.5				50 50			
75µM	25 75				100				100				62.5 37.5			
50µM	75 25				100				100				75 25			
25µM	87.5 12.5				100				100				75 25			
12.5µM	100				100				100				100			
LC ₅₀ : 79,9µM																

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

No ensaio com fêmeas adultas de *Schistosoma mansoni* (tabela 8), o efeito imediato do PZQ, paralisando-os num nível intenso (score=1), nas primeiras horas, só foi observado nas maiores concentrações utilizadas (50 - 100 µM). A partir do tempo de exposição de 6 horas todos os vermes apresentaram-se paralisados e na maior concentração avaliada foram observados 12,5% de vermes mortos. Esse índice aumentou no tempo de observação de 24 horas para 50% com registro de mortalidade em concentrações inferiores.

Nos vermes acometidos pelo efeito do PZQ houve formações bolhosas, enrijecimento dos movimentos peristálticos e escurecimento do tegumento, naturalmente translúcido. Nos grupos controle, o tegumento fino e delicado das fêmeas pode ser observado, em contraste, o tegumento das fêmeas expostas ao praziquantel apresenta-se com aspecto rugoso.

5.5 EFEITO DA COMBINAÇÃO MTF-PZQ CONTRA ESQUISTOSSÔMULOS, VERMES JOVENS E VERMES ADULTOS MACHOS E FÊMEAS DE *Schistosoma Mansoni* (CEPA BH)

A associação MTF+PZQ demonstrou sinergismo em todas as fases evolutivas de *Schistosoma mansoni*. Dentre as fases evolutivas testadas, algumas apresentaram um maior sinergismo e elevados índices de redução de dose (DRI). O DRI representa o grau de redução da concentração de uma droga na associação, uma relação entre a concentração reduzida utilizada na associação e o quanto seria necessário para atingir o mesmo efeito que obteve na combinação, em seu uso isolado. O índice de combinação (IC) representa o quão sinérgica uma associação é, sendo $IC < 1$. Quanto menor este valor, mais sinérgica é a associação, quanto maior, menos sinérgica, ou seja, menos preservada foi a droga. Para a determinação da IC é também necessário levar em conta o efeito que a combinação das drogas obteve na determinada proporção, ou seja, uma relação entre a preservação das drogas e o efeito que obtiveram juntas. As tabelas a seguir trazem os melhores resultados para cada fase evolutiva testada, dentre as 36 concentrações utilizadas, concentrações combinadas simultaneamente entre as LC_{50} puras e suas diluições até $\frac{1}{32}LC_{50}$.

A tabela 9 contém as melhores concentrações, das combinações utilizadas, que apresentaram sinergismo frente aos esquistossômulos. A associação mais sinérgica foi a combinação entre $\frac{1}{2}LC_{50}$ da MTF e $\frac{1}{2}LC_{50}$ do PZQ ($IC=0,42$) conseguindo eliminar 84% dos vermes. Nesta combinação a miltefosina deveria apresentar uma concentração quase 5 vezes maior para obter o mesmo efeito isoladamente, enquanto o praziquantel deveria apresentar uma concentração 4,5 vezes maior para obter o mesmo efeito isoladamente. Na combinação com a LC_{50} pura da MTF e $\frac{1}{16}LC_{50}$ do PZQ ($IC=0,49$) houve uma taxa de eficácia fixada em 78%, onde o praziquantel deveria apresentar uma concentração quase 30 vezes maior para obter o mesmo efeito isoladamente.

Tabela 9 - Efeito da miltefosina com praziquantel sobre esquistossômulos de *S. mansoni* (cepa BH) com 3 horas após 24 horas. n=50

Esquistossômulos					
Diluição Testada		MTF +PZQ* (Vermes Mortos)	IC***	Índice de Redução de Dose (DRI)	
MTF	PZQ			MTF	PZQ
0,5CL₅₀	0,5CL₅₀	18,66 +86,94 (84%)**	0,42	4,96945	4,53168
CL₅₀	0,5CL₅₀	37,32 +86,94 (86,9%)	0,58	2,61590	4,89668
CL₅₀	0,25CL₅₀	37,32 + 43,47 (86%)	0,48	2,61590	9,79337
CL₅₀	0,125CL₅₀	37,32 +21,73 (80%)	0,50	2,27297	15,8552
CL₅₀	0,0625CL₅₀	37,32 + 10,86 (78%)	0,49	2,18491	29,8925

*Valores de concentração expressos em μM .

**Percentagem de vermes mortos (n=50) avaliados.

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

As associações frente a vermes jovens com 21 dias (tabela 10) apresentaram efeitos mais sinérgicos, de acordo com o IC, utilizando a LC₅₀ da MTF junto a frações reduzidas da LC₅₀ do PZQ. Na combinação LC₅₀MTF+ $\frac{1}{8}$ LC₅₀PZQ, houve 100% de mortalidade, diminuindo a concentração do praziquantel em 28,5 vezes, com o IC=0,24. Utilizando $\frac{1}{4}$ LC₅₀ tanto do praziquantel quanto da miltefosina, houve 75% de mortalidade, com DRI consideráveis para as duas drogas e o IC=0,35. As demais combinações tiveram ótimos índices de mortalidade, porém o índice de combinação foi relativamente maior devido a menor preservação das drogas.

Tabela 10 - Efeito da miltefosina com praziquantel sobre vermes jovens de *S. mansoni* (cepa BH) após 24 horas.

Vermes Jovens					
Diluição Testada		MTF +PZQ* (Vermes Mortos)	IC***	Índice de Redução de Dose (DRI)	
MTF	PZQ			MTF	PZQ
0,25CL ₅₀	0,25CL ₅₀	10,22 + 24,14 (75%)**	0,35	5,12793	6,10566
CL ₅₀	0,25CL ₅₀	40,9 + 12,07 (85%)	0,74	1,47891	15,5971
CL ₅₀	0,25CL ₅₀	40,9 + 24,14 (90%)	0,71	1,64150	9,31798
CL ₅₀	0,125CL ₅₀	40,9 + 48,28 (100%)	0,24	4,74653	28,5299
0,5CL ₅₀	0,25CL ₅₀	20,45 + 24,14 (75%)	0,55	2,56271	6,10566

*Valores de concentração expressos em µM.

**Percentagem de vermes mortos (n=12) avaliados.

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

As associações utilizadas no ensaio com vermes adultos machos apresentaram sinergismos com os menores graus. Apenas 3 combinações mostraram sinergismo com uma taxa de mortalidade aceitável a partir de 66,4%. Apesar de sinérgicas, os IC foram os mais elevados dentre as fases evolutivas testadas. A associação $\frac{1}{8}LC_{50}MTF + \frac{1}{2}LC_{50}PZQ$ obteve o melhor índice de combinação (IC=0,5), porém com mortalidade aceitável, menor que 70%. A combinação que obteve o melhor índice de mortalidade foi $\frac{1}{2}LC_{50}MTF + \frac{1}{2}LC_{50}PZQ$, matando 83% dos vermes, porém teve o IC relativamente maior (IC=0,62) em relação aos demais por não preservar tanto as drogas, como as outras concentrações utilizadas. A tabela 11 exhibe as três combinações que apresentaram os melhores efeitos dentre as 36 combinações testadas.

Tabela 11 - Efeito da miltefosina com praziquantel sobre vermes adultos machos de *S. mansoni* (cepa BH) após 24 horas.

Vermes Adultos Machos					
Diluição Testada		MTF +PZQ* (Vermes Mortos)	IC***	Índice de Redução de Dose (DRI)	
MTF	PZQ			MTF	PZQ
0,5CL ₅₀	0,5CL ₅₀	93,85 + 1,46 (83%)**	0,62	3,17218	3,23001
0,5CL ₅₀	0,25CL ₅₀	93,85 + 0,73 (66,4%)	0,61	2,43853	4,92294
0,125CL ₅₀	0,5CL ₅₀	23,46 + 1,46 (66,4%)	0,50	9,75517	2,46147

*Valores de concentração expressos em μM .

**Percentagem de vermes mortos (n=8) avaliados.

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

Os vermes adultos fêmeas apresentaram maior susceptibilidade à associação MTF+PZQ. Apresentou o melhor índice de combinação (IC=0,14), levando em consideração a efetividade contra 100% dos vermes expostos à combinação $\frac{1}{2}\text{LC}_{50}\text{MTF} + \frac{1}{2}\text{LC}_{50}\text{PZQ}$, reduzindo em 10 vezes a miltefosina e em quase 22 vezes o praziquantel, levando em consideração a concentração que seria utilizada para obter o mesmo efeito. Outra combinação também obteve a excelente taxa de eliminação de 100% dos vermes expostos, porém ela utilizou a LC₅₀ da miltefosina sem diluições e apenas metade da LC₅₀ do praziquantel, elevando um pouco mais o índice de combinação (IC=0,24). A combinação que melhor preservou o praziquantel e obteve uma taxa de mortalidade considerável foi $\frac{1}{2}\text{LC}_{50}\text{MTF} + \frac{1}{4}\text{LC}_{50}\text{PZQ}$, com o IC=0,48, preservando em quase 7 vezes a exposição dos vermes ao PZQ. Na tabela 12 estão denotadas as cinco melhores concentrações dentre todas as 36 utilizadas.

Tabela 12 - Efeito da miltefosina com praziquantel sobre vermes adultos fêmeas de *S. mansoni* (cepa BH) após 24 horas.

Vermes Adultos Fêmeas					
Razão Testada		MTF +PZQ* (Vermes Mortos)	IC***	Índice de Redução de Dose (DRI)	
MTF	PZQ			MTF	PZQ
CL₅₀	0,5CL₅₀	108,6 + 39,95 (100%)**	0,24	5,00435	21,8917
CL₅₀	0,25CL₅₀	108,6 + 19,97 (83%)	0,83	1,44788	6,93588
0,5CL₅₀	0,5CL₅₀	54,3 + 39,95 (100%)	0,14	10,0086	21,8917
0,5CL₅₀	0,25CL₅₀	54,3 + 19,97 (83%)	0,48	2,89577	6,93588
0,25CL₅₀	0,5CL₅₀	27,15 + 39,95 (66,4%)	0,60	4,69075	2,57472

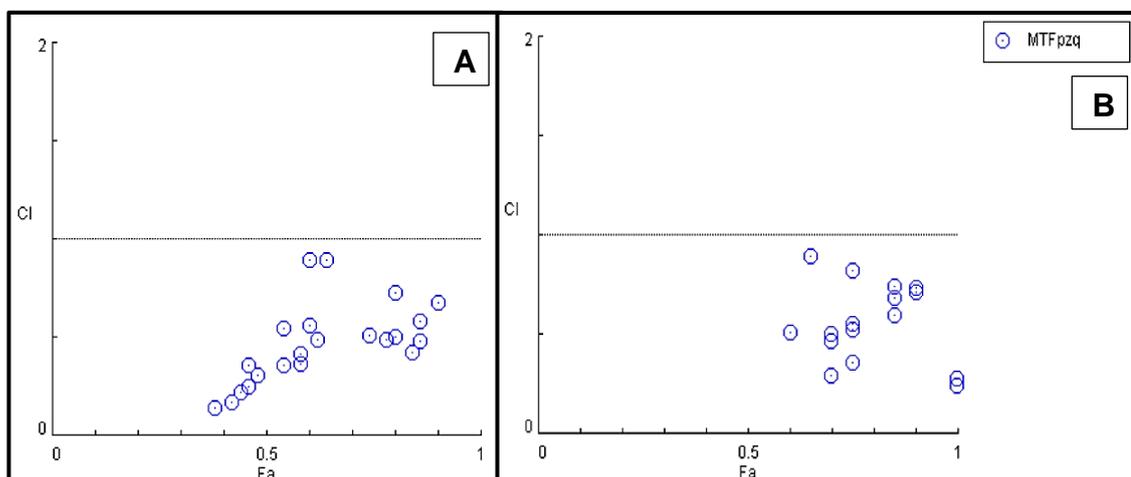
*Valores de concentração expressos em μM .

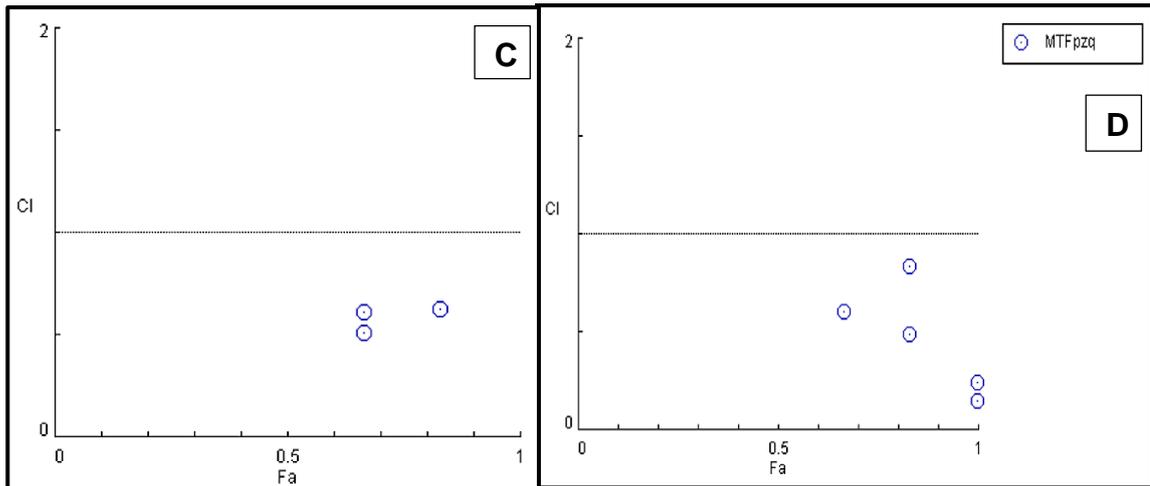
**Percentagem de vermes mortos (n=8) avaliados.

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

Os gráficos dos índices de combinação foram construídos sem a curva devido a ausência de uma razão constante que possa ligar um resultado ao outro. Cada resultado apresentou uma proporção própria entre as concentrações utilizadas, contudo, todas as combinações expressas nos gráficos abaixo mostram resultados sinérgicos em diferentes graus. Quanto mais inferior o ponto, melhor o IC, quanto mais à esquerda, maior a taxa de mortalidade.

Figura 18 - Gráficos dos índices de combinações em relação ao efeito das diferentes combinações. A) Esquistossômulos de 3h; B) Vermes jovens de 21 dias; C) Vermes adultos machos com 50 dias; D) vermes adultos fêmeas com 50 dias.





Abaixo, nas Figuras 19 e 20, os isobogramas normalizados das combinações utilizadas em cada fase evolutiva. Nos gráficos apresentados, o eixo das ordenadas (reta vertical A) ligado ao eixo das abscissas (reta horizontal B) pelo ponto 1, comum aos dois eixos, concentra os pontos sinérgicos que estão abaixo desses pontos interligados por uma reta.

Figura 19 - Isobogramas normalizados indicando os IC representados por cada ponto individual no gráfico. A) Esquistossômulos de 3h; B) Vermes jovens de 21 dias.

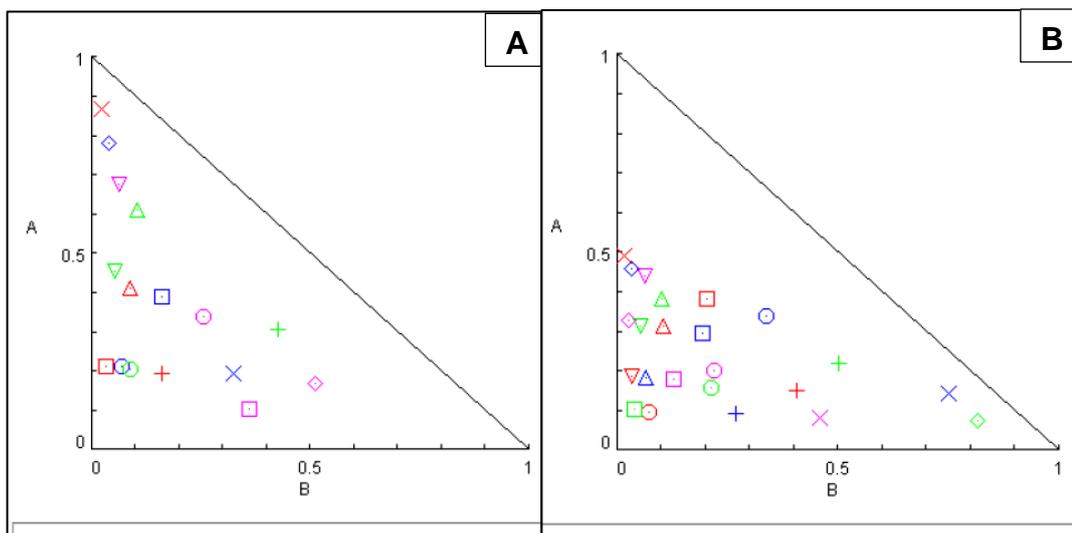
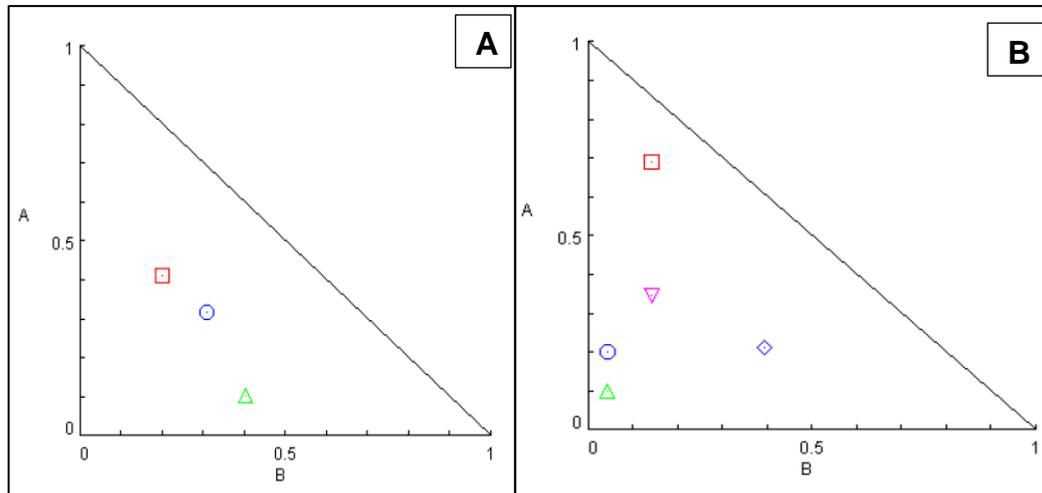


Figura 20 - Isobogramas normalizados indicando os IC representados por cada ponto individual no gráfico. A) Vermes adultos machos de 50 dias; B) Vermes adultos fêmeas de 50 dias.



5.6 EFEITO DA COMBINAÇÃO MTF-PZQ EM CONCENTRAÇÕES SUBLETAIS FRENTE À OVIPOSIÇÃO DE FÊMEAS DE *Schistosoma mansoni* (CEPA BH) EM CÓPULA

As concentrações subletais utilizadas conseguiram inibir efetivamente a oviposição de fêmeas em cópula, mesmo após 72h em meio livre de quaisquer drogas. Nas combinações baseadas nas LC₅₀ de vermes machos apenas vermes de cinco combinações, dentre as 22 utilizadas, conseguiram ovipor num período de 120h expostos a diferentes concentrações (Tabela 13). Quando a IC₅₀ de vermes fêmeas foi utilizada apenas vermes de oito combinações, dentre 22 utilizadas, conseguiram ovipor num período de 120h expostos a diferentes concentrações (Tabela 14). Por outro lado, vermes fêmeas em cópula livres de quaisquer drogas (controle), demonstraram perfeito estado de oviposição. Todos os vermes permaneceram vivos e acasalados durante toda a avaliação.

Tabela 13 - Efeito da associação miltefosina/praziquantel em doses subletais baseadas na LC₅₀ de Vermes adultos machos sobre a oviposição de vermes fêmeas em cópula de *S. mansoni* (cepa BH) após 120 horas.

RELAÇÃO DA OVIPOSIÇÃO DE FÊMEAS EM CÓPULA	
DILUIÇÕES	CONTAGEM DE OVOS*
0,125MTF+1,25PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,5MTF+0,125PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,125MTF+0,0625PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,03125MTF+0,0625PZQ	2 OVOS INVIÁVEIS
0,5MTF+0,003125PZQ	2 OVOS INVIÁVEIS
CONTROLE MEIO	85 OVOS
CONTROLE DMSO	97 OVOS

*Contagem de ovos totais para poços com 3 fêmeas.

Tabela 14 - Efeito da associação miltefosina/praziquantel em doses subletais baseadas na LC₅₀ de vermes adultos fêmeas sobre a oviposição de vermes fêmeas em cópula de *S. mansoni* (cepa BH) após 120 horas.

RELAÇÃO DA OVIPOSIÇÃO DE FÊMEAS EM CÓPULA	
DILUIÇÕES	CONTAGEM DE OVOS*
0,25MTF+0,5PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,125MTF+0,5PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,0625MTF+0,5PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,03125MTF+0,5PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,5MTF+0,003125PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,3125MTF+0,25PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,125MTF+0,125PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,0625MTF+0,125PZQ	1 OVO INVIÁVEL
0,25MTF+0,0625PZQ	1 OVO INVIÁVEL
CONTROLE MEIO	153 OVOS
CONTROLE DMSO	107 OVOS

*Contagem de ovos totais para poços com 3 fêmeas.

6 DISCUSSÃO

Apesar da Esquistossomose ser uma doença antiga, com registros de existência ainda no Egito Antigo, o caminho para a cura ainda é muito limitado. A população acometida pela doença, em geral pobre, afasta a esquistossomose do foco das indústrias farmacêuticas em produzir novas estratégias de tratamento, pois o retorno capital para essas empresas não é atrativo. No entanto, o engajamento dos órgãos fomentadores para incentivo e produção de novas pesquisas existe, mesmo que de modo discreto (KATZ, 2008; BERGQUIST *et al.* 2017).

A única forma de tratamento para a doença está centrada no uso do PZQ, seguro e eficaz contra todas as espécies do gênero *Schistosoma*. Por ser tão eficaz, há mais de 40 anos não há grandes avanços na pesquisa para novos agentes esquistossomicidas. Em contraste ao posicionamento das grandes indústrias, pesquisas apontam o surgimento de cepas tolerantes ao PZQ, induzidas laboratorialmente. Este fato alerta sobre a possibilidade do surgimento de novas cepas resistentes de modo natural pelo mundo, principalmente em lugares endêmicos onde o reuso da droga é comum (BOTROS *et al.* 2005; MELMAN *et al.* 2009; COUTO *et al.* 2011). Além disso, a eficácia do PZQ é diminuída nas fases jovens do verme, o que reflete em esperar o total desenvolvimento do parasito para só assim dar início a um tratamento eficaz, sendo nessa fase adulta o período pós-postural da doença, onde se concentra os sintomas mais graves da esquistossomose, caracterizada pela resposta inflamatória intensa, formação de granulomas e megalias (KAMEL e BAYAUMY, 2017).

Com o avanço da biotecnologia e da química medicinal novas possibilidades vêm surgindo para o tratamento de doenças. A descoberta e uso de substâncias sintéticas, semissintéticas e naturais norteiam pesquisas frente a moléculas promissoras no tratamento das infecções causadas por espécies de *Schistosoma*, como hesperidina, fitol, curcumin, epiisopiloturine e o 1,3-benzodioxois. Drogas conhecidas e comercializadas para o tratamento de outras doenças também estão sendo exploradas como agentes promissores de ação antischistosoma, como é o caso do mefloquine e o trioxaquine, os quais são utilizados no tratamento da malária, porém com bons resultados frente ao gênero *Schistosoma* (LAGO *et al.* 2017).

O uso de drogas em associação sinérgica reflete algumas vantagens no tratamento de doenças. Evitam o surgimento de cepas tolerantes a drogas isoladas por utilizarem uma dose reduzida de cada droga que compõe a associação, preservando a mesma de uma exposição excessiva, bem como alcançam efeitos melhores, se comparados a suas ações isoladas. Doses reduzidas de 2 a 20 vezes, em associação com outras drogas, podem ter seus efeitos potencializados mesmo em baixa taxa de exposição. Esta é uma alternativa que vem ganhando espaço na prevenção de cepas tolerantes (LÈHAR, et al. 2009). Considerar a possibilidade de uso do Praziquantel em associação com outras drogas com efeito esquistossomicida pode ser uma boa estratégia para se ter eficácia sobre vermes jovens de *Schistosoma mansoni* e também sobre cepas resistentes do parasito.

Estudos prévios já descrevem associações do PZQ com outras drogas *in vivo* e *in vitro*, como a associação praziquantel/omeprazol *in vitro*, descrito por Almeida e colaboradores (2015), onde obteve bons resultados frente à *Schistosoma mansoni* (cepa LE). Outro estudo explorou uma promissora associação entre pipartine e epiisopiloturine com o praziquantel, *in vitro*, frente a vermes adultos do *S. mansoni* (cepa BH) (CAMPELO et al., 2017). Há ainda estudos envolvendo drogas antimaláricas, *in vivo* e *in vitro*, como arthemeter e mefloquina também em associação com o praziquantel, mostrando potenciais resultados frente a *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma japonicum* (BOTROS, 2005; KEISER, et al. 2011; GOUVEIA et al. 2018).

No presente estudo, verificamos que as fases jovens de *Schistosoma mansoni* apresentaram maior resistência ao efeito do PZQ, em comparação aos vermes adultos. Esquistossômulos de 3h, numa exposição de 24h expostos às maiores concentrações tiveram uma taxa de mortalidade respectiva relativamente inferior aos vermes adultos machos. No mesmo intervalo de 24h, vermes jovens expostos a uma concentração menor tiveram um índice de mortalidade de equivalente às concentrações mais altas das utilizadas para esquistossômulos. Enquanto as fêmeas adultas também apresentaram uma baixa sensibilidade comparada à sensibilidade apresentada pelos vermes machos adultos, corroborando os estudos de Pica-Mattocia e Cioli (2004), os quais demonstraram através de análises com a cepa Porto Rico, baixa eficácia do PZQ frente a vermes de 28 dias,

recuperando-se das contrações espásticas em concentrações de até 3 μ M. As fêmeas também apresentaram-se mais refratárias ao PZQ, quando comparadas a machos.

O mecanismo de ação do praziquantel em vermes jovens chega a ser controverso, já que o princípio de ação do PZQ está correlacionado ao influxo de cálcio e rápida contração da musculatura. Mesmo apresentando canais de cálcio em suas células, esta fase de desenvolvimento é a menos sensível à droga. Com isso, estudos moleculares vêm na busca de elucidação dos mecanismos de tolerância das diversas fases de *Schistosoma mansoni* frente ao praziquantel. Sabe-se que a multirresistência das células de mamíferos a diferentes drogas está ligada a uma glicoproteína-P (PGP), a MRP-1 e BCRP (correlacionada ao câncer de mama), de uma mesma superfamília de proteínas ABC (ATP-binding-cassette). Proteínas transportadoras dependentes de ATP as quais atuam eliminando xenobióticos e toxinas metabólicas das células. Estas proteínas são expressas em células cancerígenas com grau elevado de resistência à quimioterapia (LEONARD et al. 2003).

SATO e colaboradores (2004) e BLACKHALL e colaboradores (2008) levantaram a hipótese de que exista uma correlação entre as proteínas multirresistentes (MFPs), expressas em células tumorais e transportadores semelhantes ao encontrados em espécimes da cepa Porto Rico de *S. mansoni* e outros helmintos (SATO et al. 2004; BLACKHALL et al. 2008). Bosch e colaboradores (2004) observaram o gene SMDR2 como responsável por codificar proteínas semelhantes à PGP de mamíferos, através de clones de dois cDNA de *Schistosoma mansoni* ligados à expressão de proteínas multirresistentes. Com esses dados, Messerli e colaboradores (2009) avaliaram a correlação entre a SMDR2 e da PGP, sendo em vermes adultos de *S. mansoni* (cepa NMRI) em concentrações subletais de PZQ. Foram utilizados vermes de *Schistosoma mansoni* cepa EE2, de baixa sensibilidade ao PZQ e vermes CD1, sensíveis ao PZQ expostos pela primeira vez à droga. Num intervalo de 3 horas, houve um aumento de 3 vezes na expressão do RNA de SMDR2 em machos adultos em relação ao controle negativo (cepa NMRI).

As fêmeas particularmente não tiveram uma diferença significativa entre os grupos tratados e controle, embora o grupo controle tenha apresentado um aumento de 2 a 5 vezes do RNA de SMDR2, comparadas aos machos adultos. Os vermes adultos (cepa EE2) apresentaram níveis de RNA de SMDR2 mais de duas vezes superiores em relação aos vermes CD1 e NMRI. Esses dados corroboram nosso estudo, onde as fêmeas adultas apresentaram uma maior resistência em relação aos machos frente ao PZQ, onde a LC_{50} foi superior em relação aos machos adultos. Desta forma, entende-se que os níveis de RNA de SMDR2 em vermes adultos fêmeas não variam significativamente indicando uma resistência adquirida entre grupos tratados e controle, embora exista de modo discreto, mas supõe uma resistência naturalmente existente em relação ao efeito do PZQ.

A SmMRP1 é outra proteína presente em *Schistosoma mansoni* da cepa NMRI, homóloga ao MRP1 de células de mamíferos, uma proteína associada a resistência de multidrogas. Em vermes jovens e esquistossômulos, as concentrações do RNA de SmMRP1 foram superiores quando comparadas com as fases adultas do verme, sejam vermes macho ou fêmea. A baixa sensibilidade de esquistossômulos de 3h e vermes jovens de 21 dias frente ao praziquantel neste estudo, pode estar ligada à presença desses RNAs de SmMRP1 e SMDR2 (KASINATHAN et al., 2010).

Diferente do praziquantel, a miltefosina não age sobre os canais de cálcio, causa paralisia dos vermes sem causar contração dos mesmos. O mecanismo da miltefosina sobre células tumorais são melhores compreendidos, pois agem sobre a homeostase fosfolipídica. Apesar dos avanços nas pesquisas, o mecanismo de ação da miltefosina sobre parasitos ainda continuam amplamente desconhecidos. Bertão e colaboradores (2012) levantaram a hipótese de que a MTF agiria alterando a estabilidade da membrana e na integridade da estrutura do tegumento do verme. Sabendo que o tegumento do *S. mansoni* funciona de modo essencial para a sobrevivência e proliferação do parasito, sendo um importante mecanismo de escape frente ao sistema imunológico, absorção de nutrientes e absorção de modo seletivo de fármacos e metabolismos fisiológicos vitais, como o de lipídios e colesterol, acredita-se que nestes locais haja interferência da MTF, levando o parasito à morte (PEREIRA et al., 2011; JIMÉNES-LÓPEZ et al., 2010).

Diversos compostos conseguem interagir com o tegumento de *Schistosoma mansoni*, como a mefloquina, compostos tioxo-imidazolina e atorvastatina isolada ou em associação com o acetato de medroxiprogesterona (MANNECK et al., 2010; XIAO et al., 2010), agindo de modo determinado pelo início do tempo de ação e pelo padrão de modificação da membrana. Neste trabalho pudemos evidenciar resultados em concordância com esses estudos, onde rapidamente surgiram bolhas no corpo do verme de modo mais intenso e numeroso em relação ao praziquantel e havendo paralisia sem contração muscular (CAMPELO, 2017) As alterações do tegumento puderam ser evidenciadas tanto pelas bolhas como pela alteração da cor (alteração da cor levemente translúcida para uma coloração opaca e enegrecida), sendo eficaz na indução de destruição da membrana do parasito, corroborando os resultados de Bertão e colaboradores (2010), onde as bicamadas lipídicas do *S. mansoni* mostrou ser intensamente sensível a ação da miltefosina (BERTÃO et al., 2010).

No presente estudo a miltefosina apresentou eficácia frente a esquistossômulos e vermes jovens, em contraste aos resultados do praziquantel. A MTF aparentemente surge como uma possibilidade de preencher as lacunas existentes na eficácia do praziquantel. Isto pode ser percebido através da LC_{50} das duas drogas, a LC_{50} da miltefosina é um pouco mais que $\frac{1}{3}$ da LC_{50} do PZQ para esquistossômulos de 3h. Enquanto para vermes jovens de 21 dias, a LC_{50} da miltefosina foi menos da metade da concentração da LC_{50} do PZQ. Para vermes adultos machos e fêmeas a LC_{50} do PZQ foi menor que a concentração da LC_{50} da MTF.

Nos ensaios de associação houve sinergismo em quase todas as concentrações testadas para vermes adultos fêmeas, em contrastes a isso poucas combinações apresentaram sinergismo para vermes adultos machos. Este dado pode ser considerado promissor, levantando a hipótese de que a ação da miltefosina sobre os vermes jovens de 21 dias, esquistossômulos de 3h e vermes adultos fêmeas foi crucial para preservação do praziquantel e conseqüentemente um importante grau sinérgico, visto que o PZQ tem baixa eficácia sobre essas fases. Os melhores índices de combinação observados no ensaio com vermes adultos fêmeas foram de 0,14 e 0,24, com eliminação de 100% dos vermes e preservando em quase

22 vezes a concentração do PZQ. Além de ter sido eficaz sobre vermes adultos fêmeas, a associação MTF/PZQ foi eficaz em inibir a oviposição de vermes adultos fêmeas em copula. Esta informação é de grande relevância clínica, visto que os ovos são os causadores dos graves acometimentos da doença.

O mecanismo de ação sobre a oviposição permanece incerto, tanto para a miltefosina, quanto para o praziquantel. Sabe-se que o praziquantel possui eficácia contra os ovos, no entanto, o que faz estas drogas impedirem a oviposição ou o acasalamento necessita ser elucidado. Sabe-se que o PZQ atua sobre canais de cálcio levando à contração espástica da musculatura, enquanto a miltefosina possivelmente age sobre o tegumento dos vermes, importante instrumento para absorção de nutrientes. É possível que essas interferências comprometam o aparelho reprodutor dos vermes e em especial o das fêmeas.

Neste estudo hipotetizamos que a miltefosina isolada e associada ao PZQ possui promissora atividade esquistossomicida, bem como considerável efeito sinérgico, quando aliada ao PZQ sobre as fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* que parasitam o homem. Em todas as fases evolutivas avaliadas (esquistossômulos de 3h, vermes jovens de 21 dias, vermes adultos machos e fêmeas) houve sinergismo em diferentes graus, a depender da combinação de concentrações utilizadas, como também da própria susceptibilidade da fase evolutiva avaliada. Nestas avaliações foram observadas lesões tegumentares mais severas que as lesões causadas pelas drogas isoladas, sendo nessas ocasiões, concentrações mais elevadas do que as concentrações utilizadas em associação.

7 PERSPECTIVAS

Espera-se investigar as demais concentrações subinibitórias frente aos esquistossômulos com 3 horas. Bem como 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. Por fim, investigar *in vivo* a atividade da associação quimioterápica MTF/PZQ, por administração oral, frente as fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH). Avaliando a absorção e metabolismo da droga.

8 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, pode-se concluir que a miltefosina apresenta atividade esquistossomicida frente às fases evolutivas de *Schistosoma mansoni* (cepa BH), em especial frente a esquistossômulos de 3h e vermes jovens de 21 dias, onde seus efeitos foram mais evidentes. Seus efeitos foram observados neste trabalho, de modo isolado ou em associação com o praziquantel.

A associação Miltefosina+Praziquantel foi eficaz em provocar mortes e alterações no tegumento dos vermes nas diferentes fases evolutivas do *S. mansoni* (cepa BH) em avaliações de 24h. Outrossim, a interação dessas drogas aliadas abre novos caminhos para investigações complementares de seus efeitos in vivo, estabelecendo assim a eficácia do tratamento em associação. Na oviposição, a associação demonstrou ser eficaz ao interferir no processo ovipositor da fêmea.

Com isso, o uso de fármacos associados ao praziquantel norteia novas possibilidades para o tratamento da esquistossomose usando pequenas doses individuais de drogas combinadas. Concomitantemente, proporciona, redução dos efeitos adversos, potencialização terapêutica e eliminação das chances no surgimento de cepas resistentes ao próprio PZQ, bem como aos futuros quimioterápicos.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, G. T. et al. Synergy of omeprazole and praziquantel *in vitro* treatment against *Schistosoma mansoni* adult worms. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 9 (9): e0004086, 2015.
- ARAÚJO, N. et al. Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental *Schistosomiasis mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**.103(5): 450-454, 2008.
- ASHTON, P. D. et al. The schistosome egg: development and secretions. **Parasitology**, 122(3): 329-338, 2001.
- 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. **Memórias do Instituto 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. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 3, p. 725-728. 2001.
- BARBOSA, C. S. et al. Epidemiologia da esquistossomose no litoral de Pernambuco. **Revista de Patologia Tropical** 43 (4): 436-445, 2014.
- BAYNE, C. J. & GREVELDING, C. G. Cloning of *Schistosoma mansoni* sporocysts in vitro and detection of genetic heterogeneity among individuals within clones. **The Journal of Parasitology**, 89: 1.056-1.060, 2003.
- BERGQUIST, R. et al. Controlling schistosomiasis with praziquantel: How much longer without a viable alternative?. **Infectious Diseases of Poverty**. 6(74): 1-10, 2017.
- BERTÃO et al, Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Parasitology Research** 110:2465–2473, 2012.
- BLACKHALL, W. J. et al. P-glycoprotein selection in strains of *Haemonchus contortus* resistant to benzimidazoles. **Veterinary Parasitology** 152, 101– 107, 2008.
- 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.

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

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

BRASIL. Ministério da Saúde. **Situação epidemiológica da esquistossomose no Brasil**. Brasília. 2011.

BRUSCA, R. C. & BRUSCA, G. J. Invertebrates. Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., **Publishers Sunderland**, 1990.

CAMPOS, J. V., Aspectos epidemiológicos e distribuição espacial dos portadores de esquistossomose atendidos no Hospital das Clínicas – Pernambuco no período de 2010 a 2012, 2014.

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. pp. 393-418, FIOCRUZ, 2008.

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. **Japanese journal of medical science & biology** 49:129-149, 1996.

CHOU, T. C. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. **Cancer Research** 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*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 101 (2): 223-224, 2006.

COUTINHO, E. M. et al. Factors involved in *S. mansoni* infection in rural areas in Northeast Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 92, p. 707-715. 1997.

COUTO, F. F. B. et al. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infected *Biomphalaria glabrata* snails. **Memórias do Instituto 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.

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

EIBL H, UNGER C, Hexadecylphosphocholine: a new and selective antitumor drug. **Cancer Treatment Reviews** 17(2–3):233–242, 1990.

EISSA et al., Miltefosine Lipid Nanocapsules for Single Dose Oral Treatment of Schistosomiasis Mansoni: A Preclinical Study. **Plos One** DOI: 10.1371 November 17, 2015.

EISSA M. M. et al. Bioactivity of miltefosine against aquatic stages of *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma haematobium* and their snail hosts, supported by scanning electron microscopy. **Parasites & Vectors** 4:73, 2011.

Eklun-Natey D.T. et al., Comparative scanning electron microscope (SEM) study of miracidia of four human schistosome species. **International Journal for Parasitology** Volume 15, Issue 1, February 1985, Pages 33-42

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. **Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica**. In: Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa de vigilância e controle da Esquistossomose (PCE): diretrizes técnicas. 2a ed. Brasília : Ministério da Saúde. 2007.

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

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

GRABE, K. & HAAS, W. Navigation within host tissues: cercariae orientate towards dark after penetration. **Parasitology Research**, 93: 111-113, 2004.

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. **The Lancet Infectious Diseases**. 368:1106-18, 2006.

HASSAN, A. H. M. et al. Miracidia of an Egyptian strain of *Schistosoma mansoni* differentiate between sympatric snail species. **The Journal of Parasitology**, 89: 1248-1250, 2003.

- HE, Y. X. et al. Comparison of skin invasion among three major species of *Schistosoma*. **Trends in Parasitology**. 21:5, 2005.
- HILGARD, P. et al. Alkylphosphocholines, a new class of membrane active anticancer agents. *Cancer Chemother. Pharmacology*. 32, 90–95, 1993.
- 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.
- JIMÉNEZ-LÓPEZ J. M. et al. Alterations in the homeostasis of phospholipids and cholesterol by antitumor alkylphospholipids. **Lipids Health Dis** 9:33, 2010.
- KAMEL, R. O. A. et al. Ultrastructural alterations in *Schistosoma mansoni* juvenile and adult male worms after in vitro incubation with primaquine. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 112 (4): 247-254, 2017.
- KASINATHAN, R. S. et al. *Schistosoma mansoni* express higher levels of multidrug resistance-associated protein 1 (SmMRP1) in juvenile worms and in response to praziquantel. **Molecular and Biochemical Parasitology**. 173, 25–31, 2010.
- KATZ, N. The discovery of *Schistosomiasis mansoni* in Brazil. **Acta Tropica**. 108:69-71, 2008.
- KEISER, J. et al. Interactions of mefloquine with praziquantel in the *Schistosoma mansoni* mouse model and *in vitro*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 66(8):1791-1797, 2011.
- LAGO, E. M. et al. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. **Future Medicinal Chemistry**. 10 (1): 89-120, 2017
- LÈHAR, J. et al. Synergistic drug combinations improve therapeutic selectivity. **Nature Biotechnology**. 27(7): 659–666, 2009.
- LEONARD, G.D. et al. The role of ABC transporters in clinical practice. **The Oncologist** 8, 411–424, 2003.
- LIRA R. et al. Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. **Journal Antimicrob Chemother** 47:537–546, 2001.
- LLULL D. et al. In vitro bactericidal activity of the antiprotozoal drug miltefosine against *Streptococcus pneumoniae* and other pathogenic streptococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 51(5):1844–1848, 2007.
- LUNA, C. M. et al. Tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. 14 (2):121-129, 2010.
- MACHADO-SILVA, J. R. et al. Caracterização de cepas de *Schistosoma mansoni* por morfometria de vermes adultos provenientes de infecção unissexual. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 36: 755-757, 2003.

MACHADO-SILVA, J. R. et al. Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. **Memórias do Instituto 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.

MAIR, G. R. et al. Muscling in on parasitic flatworms. **Parasitology Today,** 14: 73-76, 1998.

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.

MARTINEZ, E. M. et al. Características morfológicas e biológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical,** 36(5): 557-564, 2003.

MASSARA C. L. et al. Esquistossomose em área de ecoturismo do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública.** 2008; 24(7):1709-1712.

McKERROW, J. J. et al. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. **Trends in Parasitology.** 19:2, 2003.

MCKERROW, J. J. Invasion of skin by *schistosome cercariae*: some neglected facts. **Trends Parasitology,** 19: 66-68, 2003.

MCLAREN, D. J. *Schistosoma mansoni*: the parasite surface in relation to host immunity. Letchworth: **Research Studies Press,** 1980.

MELMAN, S. D. et al. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases** 3(8): e504, 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.

Michel A. et al. P19: a female and tissue specifically expressed gene in *Schistosoma mansoni*, regulated by pairing with the male. **Parasitology** 127: 519-524.

MS, Ministério da Saúde. *Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde.* **Rev. Saúde Pública.** 44(1):200-202, 2010.

NEVES, David Pereira. **Parasitologia Humana.** 13ªed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2016.

NOVAES, M. R C. G. et al. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. **Química Nova.** 22(1): 5-10, 1999.

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

PIRAJA DA SILVA, M. A. Contribuicao para o estudo da schistosomiase na Bahia. **Brazil Médico**, 22: 281-283, 1908.

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

ROSS, A. G. P. et al. Katayama syndrome. **Lancet Infectious Diseases**. 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. **Journal of Parasitology**. 94 (2): 537-541, 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, V. H. B., Avaliação da atividade esquistossomicida da associação β -lapachona/praziquantel, 2018.

SATO, H. et al. Excretion of fluorescent substrates of mammalian multidrug resistance-associated protein (MRP) in the *Schistosoma mansoni* excretory system. **Parasitology** 128, 43–52, 2004.

SILVA, P. C. V., DOMINGUES, A. L. C., Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, 20(3):327-336, jul-set 2011

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

SINDERMANN et al., Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis. **Medical Microbiology and Immunology** 193(4):173–180, 2004.

SKELLY, P. J. & SHOEMAKER, C. B. Induction cues for tegument formation during the transformation of *Schistosoma mansoni* cercariae. **International Journal for Parasitology**, 30: 625-631, 2000.

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

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

VAN BLITTERSWIJK W. J., VERHEIJ M., Anticancer alkylphospholipids: mechanisms of action, cellular sensitivity and resistance, and clinical prospects. **Current Pharmaceutical Design** 14(21):2061–2074, 2008

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. et al. Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nature Genetics**, 35: 148-157, 2003.

WALOCHNIK J. et al. Cytotoxic activities of alkylphosphocholines against clinical isolates of *Acanthamoeba* spp. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy** 44:695–701, 2002.

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

WHO, World Health Organization. Disponível em: <http://www.who.int/neglected_diseases/news/Egypt_leverages_domestic_funding_to_eliminate_schistosomiasis/en/>. Acesso em 16/12/2019.

WHO, World Health Organization. **Schistosomiasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em 16/12/2019.

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 16/12/2019.

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.

YOSHINO, T. P. et al. Receptor-ligand interactions and cellular signaling at the host-parasite interface. **Parasitology**, 123: S143-S157, 2001.

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: 2126 8842
 ceua@ufpe.br

Recife, 17 de julho de 2018

Ofício nº 64/18

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
 Para: **Prof.ª Monica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque**
 Centro de Ciências da Saúde
 Departamento de Medicina Tropical
 Universidade Federal de Pernambuco
 Processo nº **23076.011235/2018-86**

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação in vitro do potencial esquistossomicida da associação Miltefosina/Praziquantel.**", Registrada com o nº **23076.011235/2018-86** sob a responsabilidade de **Prof.ª Monica 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 04/07/2018.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	05/07/2018 a 29/07/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogenico
Nº de animais	60
Peso/Idade	30-35g/ 35 dias
Sexo	(60) Femeas
Origem	Biotério do LIKA/UFPE

Atenciosamente,

Prof. Sebastião R. F. Silva
 Vice-Presidente CEUA/UFPE
 SIAPE 2345694

