

## Parte IV - Tratamento

### 28 - Terapêutica experimental da Esquistossomose mansoni

Naftale Katz

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

KATZ, N. Terapêutica experimental da Esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, OS., COELHO, PMZ., and LENZI, HL., orgs. *Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2008, pp. 822-847. ISBN 978-85-7541-370-8. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.

---



All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International license](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença [Creative Commons Atribuição 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia [Creative Commons Reconocimiento 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

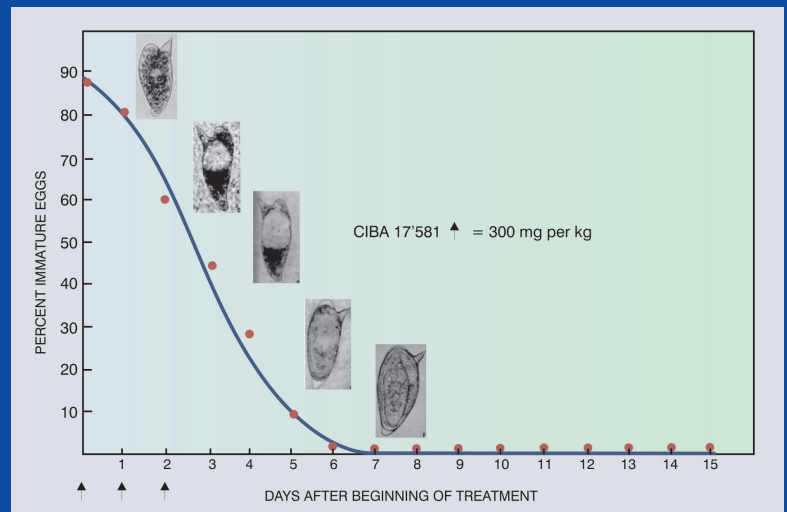
**PARTE IV**

# Tratamento

# 28 Terapêutica Experimental da Esquistossomose Mansoni

Naftale Katz

Curva de desaparecimento dos ovos imaturos após a ação da droga.  
Fonte: modificado de Pellegrino & Katz (1968).



Nas três últimas décadas houve uma significativa melhoria na eficiência terapêutica do tratamento contra a esquistossomose mansoni, com a introdução de duas drogas (oxamniquine e praziquantel) que, administradas em dose única, por via oral, apresentam atividade terapêutica elevada e baixos efeitos colaterais, o que permitiu o tratamento de milhões de pessoas infectadas.

É possível que o advento dessas drogas, associado à ocorrência da esquistossomose somente em países em desenvolvimento ou subdesenvolvidos, portanto com baixa capacidade de compra, tenha feito com que as indústrias farmacêuticas não se interessassem em promover investimentos vultosos para descobrirem novos fármacos contra essa, ainda, importante parasitose.

Considera-se especialmente o praziquantel como uma droga com muitas das propriedades que se deseja para uma droga ideal, ou seja:

- ▶ ausência ou freqüência baixa de efeitos colaterais e tóxicos para o homem;
- ▶ alta atividade curativa nas três principais espécies que parasitam o homem (*Schistosoma mansoni*, *S. hematobium* e *S. japonicum*);
- ▶ eficácia em dose única;
- ▶ administração oral;
- ▶ atividade contra todos os estágios do parasito;
- ▶ estabilidade química em comprimidos ou suspensão, com vida longa 'na prateleira', sem necessidade de armazenamento especial;
- ▶ e por último, mas não por fim, baixo custo, continua existindo a necessidade de descobrimento de novos agentes contra a esquistossomose.

É claro que poderiam ainda ser acrescentadas outras qualidades, tais como ação sobre todas as cepas do parasito, nas diferentes regiões do mundo, compatibilidade farmacológica com outras drogas etc. Todavia, as sete qualidades antes referidas bastam para servir como orientação na busca de novos fármacos, pois a droga ideal para a esquistossomose ainda não existe. Não só não existe, como não tem sido procurada.

Considerada como uma doença negligenciada, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a esquistossomose tem recebido pouco investimento em pesquisa sobre novas drogas, nas últimas décadas. De fato, progressos significativos não têm sido alcançados também no desenvolvimento de novas técnicas para o estudo experimental de novos fármacos para a esquistossomose. Portanto, para revisões mais detalhadas sobre técnicas de manutenção do ciclo e dos testes de avaliação de drogas, continuam válidas as realizadas por Standen (1963), Pellegrino & Katz (1968) e Katz & Pellegrino (1974). Para uma visão atualizada sobre drogas em uso hoje em dia e/ou em desenvolvimento, sugere-se a revisão de Cioli, Pica-Mattocchia & Archer (1995).

## NOVOS FÁRMACOS: OBJETIVOS E ABORDAGENS

Na busca de novos fármacos para a terapêutica experimental, deve-se considerar os objetivos a serem percorridos para a produção de drogas com funções diferentes, tais como: drogas profiláticas, que irão prevenir a infecção, por agirem nas formas jovens do verme; drogas supressoras, que acabem com a postura das fêmeas e, portanto, eliminem o principal agente patogênico, o ovo, além de interromper a transmissão da parasitose; e drogas curativas, que matam todos (ou quase) os vermes maduros, interrompendo a infecção.

Uma quarta abordagem poderia ser a da busca pela droga antipatologia, isto é, que produziria a reversão das lesões já ocasionadas por *S. mansoni*, especialmente a reversão da fibrose e das alterações hemodinâmicas. Hoje se sabe que, para as drogas esquistossomicidas que têm sido utilizadas na rotina clínica, essa involução acontece após um ou dois anos da cura, especialmente nos casos da forma hepatoesplênica recente, mas esse assunto não será tratado neste texto.

Para o encontro de novos agentes esquistossomicidas, três abordagens têm sido utilizadas, a saber: a empírica, a seletiva e a bioquímica. Nos últimos anos foi acrescentada uma quarta abordagem, que é a genômica.

A abordagem empírica é aquela segundo a qual se usa um grande número de fármacos sem nenhuma seleção prévia, visando encontrar uma substância líder ou guia. Essa abordagem exige uma 'procura da agulha no palheiro' (Standen 1963). Como essa metodologia é muito dispendiosa, pois são milhares as substâncias a serem triadas, tentativas foram feitas para se utilizar o teste *in vitro*, no qual a droga é adicionada ao meio de cultura, onde os vermes de *S. mansoni* sobrevivem por várias semanas. Todavia, não foi encontrada correlação entre a eficácia da atividade esquistossomicida *in vitro* (*S. mansoni*) e a eficácia da atividade *in vivo* (camundongos) de vários fármacos, a saber: diaminodifenoxialcanos, alta atividade *in vivo* (Raison & Standen, 1955) e baixa *in vitro* (Bueding & Penedo, 1957); glucosamina, que demonstrou alta atividade *in vitro*, sem atividade *in vivo* (Brenner, 1960; Pellegrino et al., 1962). Vale a pena citar os compostos hycantone e UK 3883, que não apresentam atividade *in vitro* contra os vermes de *S. mansoni*, mas após administrados nos animais (e no homem) dão origem a metabólitos hidroximetilados, que são respectivamente: o hycantone e a oxamniquine, e que passam a apresentar ação contra os vermes *in vitro* (Cioli, Pica-Mattocchia & Archer, 1995).

A abordagem seletiva pede a investigação biológica de compostos quimicamente derivados daquele, guia, que anteriormente demonstrou ter alguma atividade esquistossomicida.

Os conhecimentos de hoje permitem várias modificações químicas estruturais em compostos promissores para que, por intermédio de ensaios, se chegue à melhor estrutura/atividade de uma droga.

Seguramente, todas as drogas utilizadas na clínica como esquistossomicidas passaram por essa fase (por exemplo: Miracil D, que deu origem ao hycantone, e o mirasan, à oxamniquine) (Foster & Cheetham, 1973).

A abordagem bioquímica é aquela que, se utilizando do conhecimento dos processos metabólicos do parasito, sejam químicos ou fisiológicos, visa encontrar agentes que possam interferir sobre os mesmos. Apenas para exemplificar, recentemente, com base na incapacidade dos vermes de *S. mansoni* de produzir ácidos graxos, de novo foi demonstrada a possível utilidade da lovastatina, potente inibidor da síntese endógena do colesterol, em uso clínico corrente como anticolesterolêmico (Araújo et al., 2002).

A mais recente abordagem, a genômica, surge como uma grande promessa. De fato, com o conhecimento da seqüência genética no parasito, e em comparação com os genes existentes em outros seres vivos, seria possível encontrar alvos farmacológicos para compostos que já estejam inclusive em uso clínico para outras doenças.

Neste capítulo, serão abordados aspectos fundamentais como a manutenção do ciclo de *S. mansoni* em condições de laboratório, os animais utilizados no laboratório, os métodos para triagem de drogas e para os ensaios não clínicos e os resultados experimentais de alguns compostos que vêm sendo utilizados na clínica para tratamento da esquistossomose ou que ainda se encontram em fase de desenvolvimento.

## MANUTENÇÃO DO CICLO DE *S. mansoni* NO LABORATÓRIO

A manutenção do ciclo de *S. mansoni* no laboratório é fundamental para a obtenção de resultados confiáveis. É requisito para todos os laboratórios, inclusive aqueles localizados em zonas endêmicas. É necessário que sejam utilizadas metodologias e amostras padronizadas, tanto do parasito como dos hospedeiros vertebrados e invertebrados, e mantidas as boas práticas de laboratório.

A manutenção do ciclo de *S. mansoni* é geralmente feita com camundongos albinos e caramujos *Biomphalaria glabrata*.

### Criação de *B. glabrata*

Para manutenção do caramujo em laboratório devem ser utilizados aquários (de vidro ou de plástico), com água corrente e boa oxigenação. A água utilizada deve ter ph entre 7,2 e 7,8 e ser isenta de cloro, cobre ou zinco, que mesmo em quantidades mínimas dificultam a sobrevivência dos caramujos. Para tanto, a água será filtrada e tratada ou deverá ser proveniente de poço, analisada e testada previamente.

As desovas são obtidas facilmente, colocando-se os caramujos adultos finais e estendendo-se na superfície da água do aquário folhas de polietileno ou placas de isopor, nas quais os caramujos depositam, preferencialmente, suas desovas. Mantida a temperatura constante em torno de 24°C, os caramujos eclodem após seis dias. Esses caramujos recém-eclodidos devem ser mantidos por duas semanas com uma dieta constituída de uma mistura de ração balanceada para roedores acrescida de 10% de carbonato de cálcio, em forma de pasta. Em seguida, são transferidos para aquários de vidro ou caixas plásticas tendo ao fundo uma camada de areia, recoberta por uma camada de terra finamente pulverizada e autoclavada previamente e com adição de carbonato de cálcio. A oxigenação, muito importante, pode ser feita mediante borbulhamento de ar comprimido. A alimentação é constituída de alface fresca, lavada em solução de ácido acético a 10% e ração para roedores, em pequenas quantidades. Nessas condições, os caramujos vivem por vários meses, sem necessidade de limpeza dos recipientes, e mantêm contínua a atividade da oviposição (Pellegrino & Katz, 1968).

### Infecção de *B. glabrata*

É importante que a linhagem de *B. glabrata* seja altamente susceptível às linhagens de *S. mansoni* mantidas no laboratório.

Os miracídeos de *S. mansoni* são obtidos dos tecidos do fígado de camundongos ou *hamsters* experimentalmente infectados. A suspensão dos tecidos homogeneizados em liquidificador, em solução

salina a 0,85%, é deixada para sedimentação, em temperatura ambiente, no escuro. Após várias lavagens, por decantações sucessivas, o sedimento é suspenso em água desclorada com temperatura entre 28°C-30°C e exposto à luz. A maioria dos miracídios eclode após alguns minutos devido ao estímulo da tensão osmótica baixa da água, da temperatura e da luz. Obtidos os miracídios, a infecção dos caramujos pode ser individual ou em massa. Para esta última, basta transferir os miracídios para o recipiente contendo os caramujos com água desclorada; e, para a primeira, coloca-se o caramujo de mais ou menos 6 mm a 8 mm de diâmetro de concha em vidro de boca larga de 12 ml de capacidade, com pouca água, o suficiente para que o animal possa se movimentar. A infecção, como rotina, é feita com dez miracídios por caramujo, deixando-os juntos por algumas horas. Os caramujos são transferidos para uma estufa ou sala, onde devem ser mantidos a 28°C. Após trinta dias, examinam-se os caramujos, colocando-os individualmente em pequenos vidros com água e expondo-os à luz, quando 60% a 80% dos caramujos deverão eliminar cercárias, enquanto os não infectados deverão ser eliminados. Os caramujos infectados vivem em torno de quarenta dias, podendo alguns sobreviver apenas alguns meses (Pellegrino & Katz, 1968).

### Infecção de Animais de Laboratório

Para a manutenção do ciclo são comumente utilizados camundongos albinos e/ou *hamsters*.

#### Camundongo

O camundongo (*Mus musculus*) é considerado o animal de escolha padrão, seja pela facilidade de criação e manuseio, por ser um bom hospedeiro ou por se comportar perante a infecção esquistossomótica de maneira semelhante ao homem. Esse animal pode ser infectado facilmente pelas vias intraperitoneal, transcutânea ou subcutânea. Prefere-se, no Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz, a via subcutânea, por facilidades técnicas e bons resultados na recuperação dos vermes.

Animais de 20 g (de preferência de um único sexo) são inoculados por injeção no dorso, abaixo da cabeça, com 100-120 cercárias, sem necessidade de anestesia. Praticamente todos os animais infectam-se, e a taxa de recuperação gira em torno de 20-30 vermes adultos, 45 dias após a infecção.

Para que não haja desproporção entre os esquistossomos machos e fêmeas recuperados, devem-se utilizar cercárias provenientes de trinta ou mais caramujos infectados.

A taxa de mortalidade gira em torno de 10%-20% até o quinquagésimo dia. Após este tempo, há grande aumento na mortalidade, devido a alterações teciduais ocasionadas pelos ovos (Pellegrino & Katz, 1968).

#### Hamster

Esse roedor (*Mesocricetus auratus*) é também um bom hospedeiro, facilmente infectado por cercárias de *S. mansoni* quando inoculado pelas vias transcutânea, intraperitoneal, subcutânea e pela bolsa alimentar (Berberian & Freele, 1964).

Para Pellegrino, De Maria & Faria (1965), esta última via deve ser a preferida, visto que proporciona simplicidade, rapidez e eficiência, mas é a via subcutânea a usada preferencialmente no Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz.

A recuperação de esquistossomos é muito elevada (30% a 50%), e a mortalidade dos animais infectados é baixa até o quinquagésimo dia, quando expostos a 60-80 cercárias (Pellegrino, De Maria & Faria, 1965).

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TERAPÊUTICA

Duas fases distintas e sucessivas devem ser consideradas na avaliação da atividade terapêutica de novos esquistossomicidas: triagem e ensaios não clínicos. Na fase de triagem se pretende ensaiar um número grande de produtos na busca de um guia. A metodologia a ser usada deve ser sensível, simples e de custo baixo, por ser muito trabalhosa e apresentar poucos resultados. De fato, é necessária a triagem de mais de vinte mil compostos para o encontro de um que apresente atividade esquistossomicida, quando se utiliza a abordagem empírica. O mais comum nessa fase é usar o modelo '*S. mansoni*-camundongo'. Uma vez encontrado o composto ativo, procura-se saber o máximo sobre o mesmo e inicia-se a fase seguinte dos ensaios não clínicos. Nessa fase são utilizados diferentes animais, entre os quais podem ser citados: camundongo (*Mus musculus*), hamsters (*Mesocricetus auratus*); ratos silvestres (*Nectomys squamipes*, *Mastomys natalensis*) e macacos (*Macaca mulata*, *Cercopithecus* sp, *Cebus appela*).

Neste capítulo serão considerados apenas o camundongo, o hamster e o macaco *Cebus*.

Na fase dos ensaios não clínicos interessa também conhecer a menor dose eficaz, os possíveis efeitos colaterais e tóxicos, a melhor via de administração, a ação sobre as diferentes fases evolutivas do verme, enfim, a obtenção do maior número possível de informações antes de se passar para o objetivo final, que é o ensaio clínico. Estima-se que de cada dois a três mil compostos ativos encontrados na fase de triagem, apenas um vai se transformar num agente terapêutico a ser utilizado na clínica. Se, por um lado, durante a triagem, deve-se utilizar de preferência um, no máximo dois, indicador que revele atividade sobre os parasitos, na fase seguinte, maior número de indicadores deve ser avaliado para que se possa demonstrar a eficiência da atividade terapêutica, bem como o estudo do mecanismo e o modo de ação da droga.

Assim, no Laboratório de Esquistossomose do Centro de Pesquisa René Rachou/Fiocruz, utiliza-se como método de escolha na triagem de drogas o oograma. Já na fase de ensaio não clínico são acrescentadas outras informações, como: distribuição de vermes no sistema porta, presença de vermes mortos no fígado, além do oograma. Posteriormente, para o estudo do mecanismo de ação das drogas sobre *S. mansoni*, usa-se a microscopia ótica e eletrônica, bem como a histoquímica e ensaios *in vitro* que podem fornecer informações adicionais importantes.

As metodologias de avaliação de compostos com atividades profiláticas ou supressivas de postura de ovos são diferentes e serão discutidas mais adiante.

### Triagem de Drogas *In Vivo*

O camundongo é o animal de escolha para triagem de drogas, tendo apenas Berberian & Freele (1964) sugerir o hamster. Entre os diversos métodos e critérios propostos para a triagem de drogas em camundongos pode-se citar: contagem de ovos nos tecidos (geralmente fígado e/ou intestino e nas fezes), contagem de granulomas no fígado e aumento da sobrevivência dos animais tratados (Pellegrino & Katz, 1968).

Atualmente, para a triagem de drogas usam-se principalmente alterações no oograma, ao qual se podem ser acrescentados distribuição dos vermes, redução do número de vermes e presença de vermes mortos no fígado (Pellegrino & Katz, 1968).

A distribuição dos vermes no sistema porta de camundongos experimentalmente infectados por *S. mansoni*, aos 45 dias, quando a quase totalidade de vermes já atingiram a maturidade sexual e iniciaram a postura de ovos, é de 60%-70% nos vasos mesentéricos, 20%-30% na veia porta e 0%-20% nas veias intra-hepáticas. A administração das drogas ativas contra *S. mansoni* em camundongos infectados



produz um deslocamento parcial ou total dos vermes para o fígado (Pellegrino & Katz, 1968). É importante lembrar que os anestésicos (por exemplo, éter etílico ou clorofórmio) também produzem esse deslocamento, e, assim, o sacrifício dos animais a serem examinados deve ser feito por fratura cervical (Khayyal, 1965).

A redução do número de vermes é medida após a perfusão do sistema porta dos camundongos para a retirada dos vermes; faz-se a contagem dos vermes, considerando-se separadamente machos, fêmeas e acasalados. Faz-se também o esmagamento do fígado para encontro dos vermes imobilizados por tecido inflamatório. O número total de vermes é comparado então com aquele encontrado no grupo de camundongos não tratados (controle) (Pellegrino & Katz, 1968).

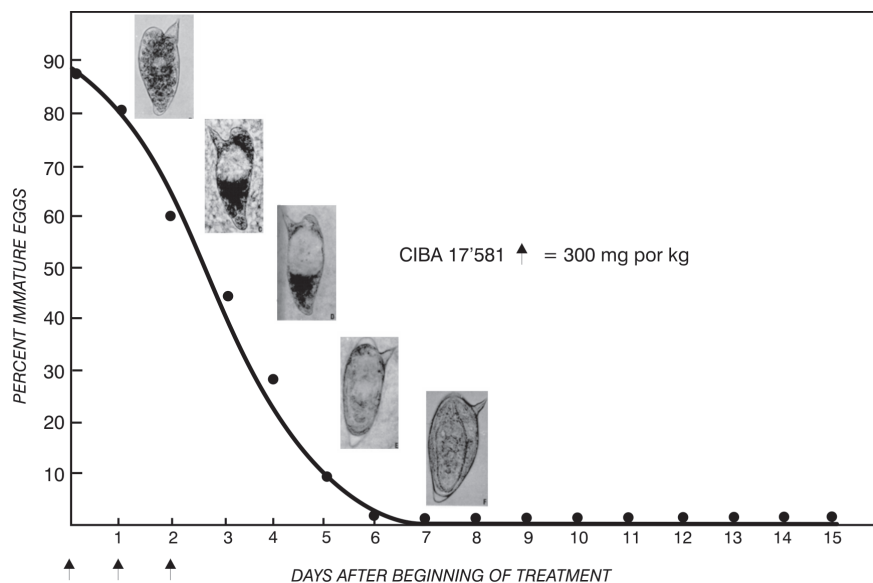
Por comparação com os vermes do grupo controle (não tratado), observa-se também o tamanho dos vermes e a pigmentação dos vermes fêmeas.

O estudo do oograma (método de Pellegrino et al., 1962) deve ser o preferido para avaliação de triagem de drogas e também constar sempre nos ensaios não clínicos de agentes ativos contra o *S. mansoni*.

O método do oograma tem o seguinte embasamento teórico e metodológico: nas infecções experimentais balanceadas, a partir do trigésimo dia de inoculação os vermes fêmeas iniciam a postura de ovos ainda imaturos, que levam em torno de seis dias para o amadurecimento completo, isto é, para que o embrião de primeiro estágio atinja a forma de miracídio (Pellegrino et al., 1962; Gonnert, 1955; Prata, 1957).

Para demonstração clara do fenômeno de interrupção da postura, camundongos foram tratados com uma droga ativa (derivado tioxantônico – Ciba 17,581) que provoca um deslocamento rápido dos vermes para o fígado (Pellegrino & Katz, 1968). Os camundongos foram sacrificados a cada 12 horas após o tratamento, e examinando-se ao microscópio fragmentos de seus intestinos delgados foi possível determinar o tempo necessário para maturação (e desaparecimento) dos ovos. De fato, ovos de primeiro estágio desaparecem já no segundo dia após o tratamento; ovos do segundo estágio, no quarto dia; do terceiro estágio, no quinto dia; do quarto estágio, no sétimo dia; e os ovos maduros levam sete dias para serem formados, portanto podem persistir até mais de 12 dias na parede intestinal (Figura 1).

Figura 1 – Curva de desaparecimento dos ovos imaturos após a ação da droga



Fonte: modificado de Pellegrino & Katz (1968).

O oograma, portanto, é o método que, examinando fragmentos de tecidos ao microscópio, permite, por meio da análise morfológica, identificar os diferentes tipos de ovos de *S. mansoni*, que são classificados como viáveis ou mortos. Dentre os ovos viáveis, há os imaturos (primeiro estágio: o embrião ocupa menos de 1/3 do diâmetro do ovo; segundo estágio: metade do diâmetro; terceiro estágio: 2/3 do comprimento do ovo; quarto estágio: ocupa praticamente todo o ovo) e os maduros (miracídios totalmente desenvolvidos). Esses ovos podem morrer quando imaturos e darão origem aos ovos hemitransparentes, granulados ou com embrião retraído. Se morrerem após a maturidade, os ovos maduros podem dar origem aos ovos com miracídios retraídos, granulações grosseiras e calcificados. Também podem ser encontradas somente as cascas, sem sinal do miracídio ou das células vitelinas.

Em duzentos camundongos experimentalmente infectados por *S. mansoni* – de cada animal foram contados e classificados cem ovos nos fragmentos intestinais –, foi observada a seguinte proporção: primeiro estágio: 15%; segundo estágio: 14%; terceiro estágio: 25,3%; quarto estágio: 11,6%; ovos maduros: 29,2%; e ovos mortos e cascas: 4,9% (Pellegrino & Katz, 1968).

Após o tratamento, a ausência de qualquer um dos estádios dos ovos viáveis é indicação de que houve parada de postura e que, portanto, a droga tem atividade sobre *S. mansoni*. Embora na maioria das vezes a interrupção da postura possa indicar que a droga é esquistossomicida, nem sempre isso é verdade, pois são vários os compostos que produzem apenas paradas (temporárias ou definitivas) da postura sem matar os vermes (drogas supressoras).

Para a triagem de drogas, após ensaios preliminares do teste de toxicidade, as drogas são administradas em grupos de cinco camundongos albinos (Swiss) na dose diária correspondente a 1/5 da LD50 (dose letal para metade dos animais), por cinco dias consecutivos, de segunda a sexta-feira, 45-50 dias após a infecção dos animais com 100-120 cercárias de *S. mansoni*, por via subcutânea, no dorso de cada um. São utilizados camundongos de ambos os sexos, pesando em torno de 20 g. A droga é administrada por via oral (gavagem com agulha apropriada) e/ou intramuscular, com preferência para a primeira. Droga com solubilidade acima de 10% é administrada por via intraperitoneal, e aquelas com solubilidade baixa são administradas, por via oral, em suspensão de gelatina a 5%.

Três dias após a última dose, os animais são sacrificados por esmagamento cervical. Rompe-se a pele do abdômen e abre-se a cavidade peritoneal. Retira-se, com auxílio de tesoura, 2-3 fragmentos, de 1 cm cada, da parte distal do intestino delgado. Abre-se longitudinalmente o intestino, que é então lavado em água corrente e colocado para secar sobre papel absorvente. Comprime-se o fragmento do intestino entre duas lâminas de vidro. São contados e classificados de cem a duzentos ovos, utilizando-se o microscópio ótico. Todavia, se o exame de uma dezena de campos já revelar ovos viáveis de todos os estádios, não é necessário fazer contagem, e a droga é considerada inativa.

Uma droga é considerada ativa e, portanto, merecedora de ensaios posteriores, quando um dos estádios dos ovos viáveis imaturos está ausente.

## Ensaio Não Clínicos

Para os ensaios não clínicos, todas as drogas que se mostraram ativas no método do oograma são, no laboratório, ensaiadas em camundongos, *hamsters* e macacos *Cebus* experimentalmente infectados por *S. mansoni*. São observados especialmente o número total de vermes recuperados por perfusão e os retidos no fígado, a distribuição na veia porta, nas veias mesentéricas e intra-hepática, a presença de

vermes mortos no fígado e o oograma. Observam-se ainda a pigmentação das fêmeas e o tamanho e mesmo alguma alteração morfológica dos vermes. Para o encontro de drogas curativas e/ou supressoras, camundongos (albinos Swiss) em grupos de 10-12 animais, após 45-50 dias infectados com 100-120 cercárias de *S. mansoni*, por injeção subcutânea no dorso, são tratados, normalmente, por via oral, com doses múltiplas (cinco dias) ou únicas dos compostos. As doses utilizadas são baseadas nos resultados encontrados na fase de triagem anteriormente realizada. O período do sacrifício dos animais pode ser de três ou sete dias após o tratamento. Após perfusão, são observados principalmente o oograma, o número total de vermes encontrados, considerando-se machos e fêmeas acasalados, a sua distribuição no sistema porta-hepático (fígado, veia porta e mesentéricas), a porcentagem de vermes mortos no fígado, além dos aspectos morfológicos dos vermes.

Grupo de cinco a sete *hamsters* adultos (*Mesocricetus auratus*), entre sete e oito semanas após a infecção com 60-80 cercárias de *S. mansoni*, pela bolsa alimentar, é tratado com doses decrescentes do composto a ser ensaiado, por até cinco dias ou em dose única, usualmente por via oral.

Os parâmetros a serem observados são os mesmos citados anteriormente para o exame dos camundongos.

Os macacos utilizados nestes ensaios são *Cebus appela macrocephalus* (macaco-prego), que, embora de difícil manuseio, apresentam resultados muito parecidos com aqueles encontrados no homem, mas também outras espécies de *Cebus*, como *C. appela appela* e *C. libidinosus*.

Os animais, após imobilização, são infectados por via transcutânea, com 150-200 cercárias de *S. mansoni*. O tratamento inicia-se quatro meses após a infecção, após confirmação do sucesso da infecção através de curetagem retal. Doses múltiplas, por até cinco dias, ou única, por via oral, são utilizadas, baseando-se na definição da dose nos resultados previamente obtidos nos camundongos e *hamsters*.

A avaliação da atividade da droga é feita através de sucessivas curetagens retais, realizadas antes e em diferentes períodos após o tratamento, até o quarto mês. O método de curetagem é rápido, simples e fornece informações preciosas por intermédio do oograma. Em geral, quatro fragmentos são retirados, com cureta, da mucosa retal e pesados em balança analítica, comprimidos entre lâmina e lamínula e examinados ao microscópio (Katz, Pellegrino & Memoria, 1966). Os elementos esquistossomóticos são contados e classificados (ovos imaturos de primeiro a quarto estádios, maduros, mortos e cascas). A avaliação da atividade terapêutica baseia-se nas alterações encontradas no oograma, representada pelo desaparecimento gradativo dos ovos viáveis.

Pesando-se os fragmentos obtidos por curetagem retal e contando-se os ovos encontrados, pode-se calcular o número de ovos por grama de tecido retal. Essa abordagem quantitativa (Katz, Pellegrino & Memoria, 1966) é de grande valia na avaliação da atividade de droga contra esquistossomose (Katz & Pellegrino, 1974b) e semelhante à sugerida para ensaios clínicos humanos (Cançado et al., 1965).

Os macacos *Cebus* – nos quais a persistência da parada da postura, evidenciada pelo oograma, que registrou desaparecimento dos ovos viáveis imaturos e maduros, mantém-se por quatro meses ou mais – são sacrificados e perfundidos na tentativa do encontro dos vermes no fígado ou no sistema porta, após a ingestão da droga que está sendo ensaiada, e os seus órgãos são também utilizados para estudos anatomopatológicos (Pellegrino & Katz, 1968).

As vantagens do uso do macaco *Cebus* em ensaios não clínicos na esquistossomose mansonii são:

- custo relativamente baixo;
- manutenção adequada em condições de laboratório;

- porcentagem alta de cercárias que se transformam em vermes adultos (30% a 50%);
- elevado número de ovos nas fezes e na mucosa retal;
- infecção persistente por vários anos;
- boa correlação com os resultados obtidos na clínica humana, no que se refere à resposta terapêutica a drogas (Pellegrino & Katz, 1968; Katz & Pellegrino, 1974b).

### Avaliação Quantitativa da Atividade Antiesquistossomótica

É muito importante que se faça uma avaliação quantitativa da atividade antiesquistossomótica, pois ela vai orientar na escolha do melhor composto de uma série, antes do início dos ensaios clínicos em voluntários. Entretanto, permite também fazer comparações de atividade entre drogas e doses diferentes, possibilitando estudos mais exatos e comparações mais precisas.

Os critérios de avaliação anteriormente mencionados devem ser, sempre que possível, analisados quantitativamente. Assim a porcentagem da redução da carga parasitária nos animais tratados, bem como o percentual do número de vermes no fígado, na veia porta e nos vasos mesentéricos são comparados com os do grupo-controle.

A dose efetiva (DE), isto é, aquela que mata 50% (DE<sub>50</sub>) ou 90% (DE<sub>90</sub>) dos vermes, colocada em relação à LD<sub>50</sub> (dose letal para 50% dos animais tratados), indica o índice terapêutico (IT). Também para o oograma pode-se medir o DO<sub>50</sub> (dose diária em mg/kg, administrada por um ou cinco dias consecutivos e que produz alteração do oograma em 50% dos animais tratados) e depois relacioná-la à LD<sub>50</sub>.

Para macacos *Cebus*, foi adaptada a técnica do oograma quantitativo utilizado em ensaios clínicos, que mostrou ser um ótimo método quando se usa a curetagem retal nos animais em teste (Katz, Pellegrino & Memoria, 1966; Katz & Pellegrino, 1974b).

É necessário salientar que embora todos os métodos de avaliação realizados em animais de laboratório sejam muito importantes e mesmo indispensáveis, a definição de atividade de determinado composto no homem depende da realização dos ensaios clínicos.

### Triagem de Drogas *In Vitro*

Desde a década de 1950, técnicas foram descritas para testar a atividade *in vitro* de compostos sobre vermes de *S. mansoni* (Standen, 1963).

Este assunto encontra-se resumido neste capítulo, visto que os resultados dos testes de muitas drogas *in vitro* não correspondem ao que se observa *in vivo*, como anteriormente citado. O uso da cultura do verme *in vitro* para ensaios de drogas tem sua aplicação quando se quer observar alguns fenômenos morfológicos e fisiológicos, que podem ser importantes na interpretação do mecanismo de ação de drogas.

A seguir é apresentada a técnica utilizada por Pica-Mattoccia & Cioli (2004). Dez a doze vermes adultos são distribuídos em duplicatas, em tubos de cultura de tecido (3,5 cm) contendo o meio de Eagle modificado por Dalbecco, tamponado com bicarbonato, e suplementado com 20% de soro bovino fetal, ao qual se acrescenta penicilina, estreptomicina e anfotericina B. As culturas são mantidas a 37°C, em atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5% e são observadas diariamente por oito a dez dias, com auxílio de um microscópio. Diferentes concentrações das drogas são adicionadas às culturas e os vermes ficam expostos

por uma noite. No dia seguinte, os vermes são lavados por três vezes e transferidos para frascos contendo o mesmo meio de cultura sem droga. A droga pode ser dissolvida em DMSO (dimetilsulfóxido, no máximo a 0,1%) e nos frascos, que servirão de controle, é adicionado DMSO na mesma concentração (Pica-Mattocchia & Cioli, 2004).

No fim do período de observação, os vermes são considerados mortos se permanecem imobilizados por horas ou adquirem uma aparência opaca. Como medida auxiliar de avaliação, os vermes podem ser medidos.

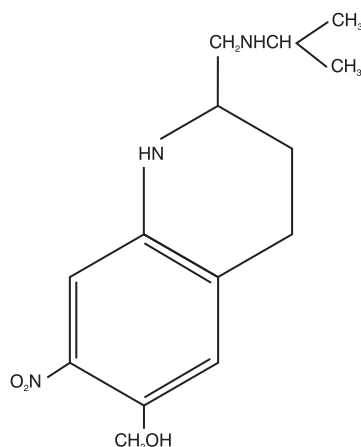
## DROGAS CURATIVAS

Resultados dos estudos experimentais de duas drogas esquistossomicidas de uso corrente na terapêutica clínica no Brasil, oxamniquine e praziquantel, são apresentados a seguir e ilustram as fases do desenvolvimento de medicamentos esquistossomicidas, desde a identificação de compostos promissores até a aprovação para uso clínico em humanos.

### Oxamniquine

Richards & Foster (1969) e Baxter & Richards (1971), trabalhando na Pfizer (Sandwich, Inglaterra), descreveram uma nova série de derivados 2-aminometil-tetra-hidroquinolínicos que apresentaram ação marcante esquistossomicida. Dos mais de cinquenta derivados ensaiados, foi escolhido como dos mais promissores o UK3883. Esse composto, além da ação curativa em dose oral única, apresentou também atividade profilática e ação contra todos os estágios imaturos em camundongos (Foster et al., 1971a, 1971b). Em várias espécies animais, sofre hidroxilação do grupo 6-metil, dando origem ao UK 4271, denominado oxamniquine (Kaye & Woolhouse, 1972; Foster, Cheetham & King, 1973; Foster, 1973).

Figura 2 – Estrutura química da oxamniquine



Fonte: Foster (1973).

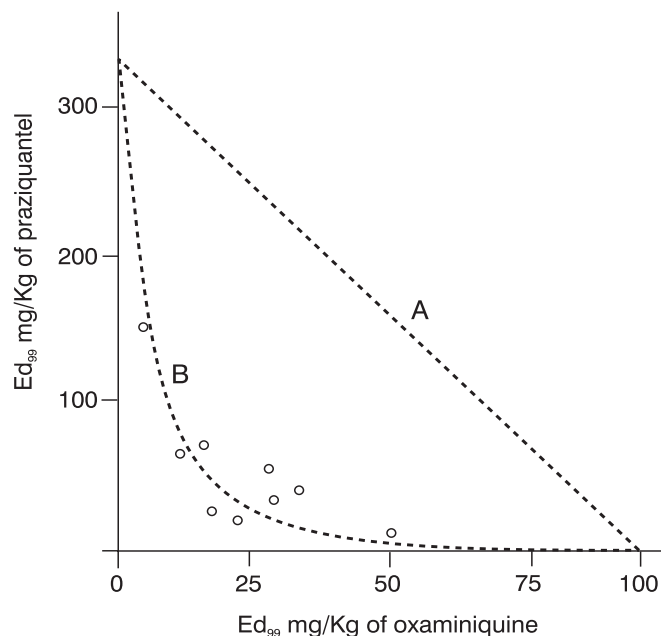
A oxamniquine, em dose oral ou intramuscular única, apresentou elevada atividade curativa contra *S. mansoni* em roedores e primatas. Em camundongos, a ED99 foi, por via oral ou intramuscular, de respectivamente 44 mg/kg e 42 mg/kg em dose única. Por via oral, em *hamsters* a atividade curativa foi semelhante à encontrada em camundongos, mas por via intramuscular foi

muito mais ativa (ED<sub>99</sub>: 12 mg/kg). Em macacos *Cebus*, a dose curativa (im ou iv) foi de 5-7,5 mg/kg, mas não apresentou atividade acentuada em *Cercophitecus e Papio*. *In vitro* a oxamniquine apresentou apenas atividade moderada, na dose de 200 ug/ml por 65-90 horas (Foster, 1973).

A oxamniquine mostrou atividade acentuada em camundongos, *hamsters* e macacos *Cebus*. Em camundongos, dose intramuscular única de 100 mg/kg produziu alterações do oograma em todos os animais tratados e deslocamento dos vermes para o fígado. Nos *hamsters*, a dose intramuscular de 50 mg/kg também apresentou efeitos semelhantes aos encontrados nos camundongos. Quatro macacos *Cebus* foram tratados com dose única de 20-40 mg/kg, im. Curetagens da mucosa retal feitas em série, antes e após o tratamento, mostraram o desaparecimento progressivo dos ovos imaturos e maduros até o 120º dia, quando os macacos foram sacrificados. Após a perfusão do sistema porta e do fígado, vermes não foram encontrados (Pellegrino, Katz & Dias, 1973).

Em todos os hospedeiros, os vermes machos mostraram-se mais susceptíveis à droga do que as fêmeas. Este fato não foi observado *in vitro* (Foster, 1973). Na fase imatura, dose única oral de 50 mg/kg, administrada durante o período pré-patente, em camundongos, reduziu o número de vermes, exceto para aqueles na terceira semana pós-infecção. De fato, a oxamniquine produziu nestes grupos redução acentuada do número de vermes (e do número de ovos nos tecidos), quando a droga foi administrada um dia após o inóculo, diminuindo sua ação aos oito e 15 dias, chegando a mostrar-se inativo aos 22 dias, voltando a ter atividade sobre os vermes imaturos aos 25 e 36 dias (Gráfico 1) (Foster, 1973). O uso da oxamniquine em camundongos 24 horas após a infecção produz grande mortalidade dos esquistossômulos na pele e aqueles que chegam aos pulmões também morrem, pois aos 35 dias não foram encontrados vermes no sistema porta dos animais (Coelho, Mello & Gerken, 1993).

Gráfico 1 – Atividade da oxamniquine (dose única oral de 50 mg/kg) contra a infecção imatura de *Schistosoma mansoni* (cepa Puerto Rico) em camundongos



Fonte: adaptado de Foster (1973).

Não foi detectada atividade eficaz contra *S. hematobium* ou *S. japonicum*. Curiosamente, as cepas de *S. mansoni* isoladas do oeste da África comportaram-se na resposta à oxamniquine de maneira semelhante aos isolados do Brasil. Já aquelas do norte (Egito e Sudão) e do lado oriental da África apresentaram menor susceptibilidade à ação da droga, seja experimental, seja na clínica.

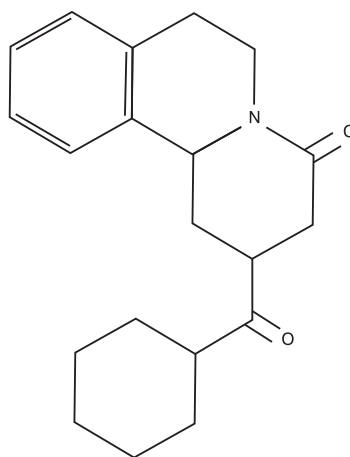
Os vermes recuperados dos camundongos após o terceiro dia de tratamento já mostravam parada da oviposição, sem que ainda houvesse deslocamento dos mesmos para o fígado. Na segunda semana, todos os vermes estavam no fígado, e a parada da postura era total. Alterações morfológicas foram mais precoces e mais intensas nos vermes machos, os quais já no terceiro dia apresentaram embebição do parênquima. No 15º dia, as alterações foram mais intensas, com vacuolização e desaparecimento dos núcleos das células do parênquima (lesão 'em bolha'). Nas fêmeas, a partir do sétimo dia, foi vista redução da quantidade do material vitelínico no ovário e despigmentação acentuada. Os vermes sobreviventes (machos e fêmeas) apresentaram diminuição significativa de tamanho e, até 120 dias após tratamento, uma grande quantidade dos vermes não havia recuperado a sua capacidade de realizar oviposição (Kohn et al., 1979).

O mecanismo de ação da oxamniquine parece estar relacionado com a capacidade de inibição irreversível da síntese dos ácidos nucléicos nos vermes (Cioli, Pica-Mattocchia & Archer, 1995).

### Praziquantel

Na década de 1970 foram iniciados os estudos conjuntos entre os laboratórios Bayer e Merck com derivados pirazinoisoquinolínicos como antiparasitários. Depois de sintetizarem mais de quatrocentos compostos, o mais promissor revelou ser o Embay 8440 ou praziquantel (2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino [2,1-a] isoquinolina-4 one) (= cicloexilcarbonil e hexaidro) (Webbe & James, 1977).

Figura 3 – Estrutura química do praziquantel



Fonte: Andrews & Thomas (1983).

De fato, além da atividade anticestódios e antitrepatódeos, o praziquantel foi a primeira droga que mostrou atividade acentuada, por via oral, ou intramuscular em dose única, contra as três principais espécies de *Schistosoma* que acometem o homem, ou seja: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum* e também contra *S. intercalatum* e *S. mattheei* (Gönnert & Andrews, 1977; Webbe & James, 1977; Andrews et al., 1983).



Ensaio experimentais mostraram que o praziquantel apresentou atividade acentuada contra várias espécies de *Schistosoma* em camundongos, *hamsters* e também em diferentes espécies de macacos. A dose ED<sub>95</sub> para camundongos infectados experimentalmente por *S. mansoni* foi de 685 mg/kg, com dose única oral de 403 mg/kg por via im; para *Mastomys*, de 278 mg/kg e 125 mg/kg, respectivamente para via oral e via im; e no *hamster*, de 249 mg/kg e 100 mg/kg, respectivamente. Em macacos, a ED variou conforme cada espécie (Gönnert & Andrews, 1977; Webbe & James, 1977). Deve-se destacar que cinco doses de 50 mg/kg administradas, em intervalos de três horas, por via oral, levaram à cura parasitológica completa, enquanto a dose única de 100 mg/kg não foi tão eficiente (Gönnert & Andrews, 1977).

No Brasil, Pellegrino et al. (1977) ensaiaram o praziquantel em camundongos, *hamsters* e macacos *Cebus* infectados experimentalmente com a cepa LE. Nos camundongos, doses orais de praziquantel de 100 e 50 mg/kg, durante cinco dias, produziram alterações significativas do oograma e deslocamento acentuado dos vermes para o fígado. Nos camundongos, o índice terapêutico foi de 153 mg/kg. Nos *hamsters*, os vermes mostraram-se mais sensíveis à droga. De fato, doses de 12,5 mg/kg/dia, durante cinco dias, produziram deslocamento dos vermes para o fígado e alterações do oograma, ambas as reações atingindo em torno de 60% dos animais. Já com dose de 25 mg/kg/dia, por cinco dias, todos os vermes foram deslocados para o fígado, com 88,6% deles retidos no mesmo e com 100% dos animais apresentando alterações do oograma; com doses de 12,5 e 6,5 mg/kg, também foram observadas estas alterações, embora num percentual bem menor de animais. Em dois macacos *Cebus* tratados por via oral com dose total de 30 e 60mg/kg, respectivamente, dividida em três administrações, no mesmo dia, embora houvesse indicações de atividade esquistossomicida, como grande redução da população de vermes, os poucos vermes sobreviventes estavam com sua postura de ovos preservada. Na necropsia, em ambos os macacos foram encontrados ovos viáveis de *S. mansoni* nos intestinos delgado e grosso, não verificados, porém, numa série de curetagens retais. Em um macaco *Cebus* tratado com dose única oral de 100 mg/kg e sacrificado após 138 dias, não foram encontrados nem vermes nem ovos nos intestinos delgados, grosso e no reto, na necrose (Katz, Rocha & Chaves, 1979).

Deve-se destacar que resultados semelhantes foram encontrados quando camundongos e macacos *Cebus* foram tratados com praziquantel por via intramuscular e, com um pouco menos de atividade, por inalação nasal (Pellegrino et al., 1977). Baseando-se nestas informações, foi sugerido que dose única oral de 20 mg/kg poderia reduzir o número de vermes de *S. mansoni*, no homem, em até 95%, o que corresponderia a uma taxa de cura de 60% (Webbe & James, 1977). Todavia, desde o primeiro ensaio clínico da esquistossomose mansoni com praziquantel, realizado no Brasil por Katz, Rocha e Chaves, em 1979, ficou claro que a dose deveria ser mais do que o dobro da sugerida pelos estudos experimentais.

Recentemente, Pica-Mattoccia & Cioli (2004) ensaiaram o praziquantel contra uma cepa de *S. mansoni* proveniente de Porto Rico, *in vitro* e *in vivo*. A dose efetiva (DE<sub>50</sub>) nos camundongos experimentalmente infectados foi trinta vezes menor no 28º dia da infecção do que a de sete semanas após a infecção. Além disto, os vermes provenientes de infecções unissexuais, seja de machos ou de fêmeas, são menos susceptíveis à droga do que as infecções com cercárias balanceadas por sexo e, mesmo nestas últimas, as fêmeas são mais susceptíveis do que os machos.

Assim, a eficácia do praziquantel é dependente da idade da infecção, do sexo dos vermes e mesmo do estado de acasalamento ou não dos vermes. Também o estado imunitário do hospedeiro parece ser importante na resposta terapêutica ao praziquantel (Pica-Mattoccia & Cioli, 2004; Sabah et al., 1985; Doenhoff et al., 1987; Brindley & Sher, 1987).



É interessante destacar que o praziquantel utilizado comercialmente é uma mistura racêmica, constituída em partes iguais dos isômeros levógiro e dextrógiro. Experimentalmente foi demonstrado que somente o isômero levógiro apresenta atividade antiesquistossomótica, embora ambos apresentem toxicidade semelhante (Xiao & Catto, 1989; Xiao et al., 1999). Também em ensaios clínicos contra a infecção por *S. japonicum* foi comprovada essa atividade do isômero levógiro do praziquantel (Wu et al., 1991). Entretanto, o isômero dextrógiro, em altas doses, também pode apresentar atividade contra o verme, especialmente produzindo deslocamento dos mesmos para o fígado, nas infecções maduras. Todavia, mesmo elevadas doses do isômero dextrógiro (até 600 mg/kg, dose oral única em camundongos infectados por *S. mansoni*) não produziram diminuição significativa do número de vermes quando comparados com o grupo-controle, ao contrário do encontrado nos animais tratados com 300 mg/kg do isômero levógiro, em que a redução foi em torno de 98% (Xiao et al., 1999).

Estudos *in vivo* e *in vitro* mostraram que o praziquantel, minutos após ingerido, produz contração dos vermes. *In vivo* acontece o deslocamento dos vermes para o fígado e após algumas horas há vacuolização intensa em diferentes partes do tegumento (Becher et al., 1980; Mehlhorn et al., 1981). *In vitro*, as lesões decorrentes são mais dependentes do tempo de exposição do que de maiores concentrações da droga. *In vivo*, nos vermes que foram deslocados para o fígado, já a partir de quatro horas, foram vistos granulócitos aderidos às vacuolizações (lesões em 'bolha'). Após 24 horas, o tegumento encontra-se quase totalmente destruído e com intenso infiltrado granulocitário, especialmente pelos eosinófilos que invadem também a intimidade dos tecidos do verme. Com 18 dias após o tratamento, praticamente todos os vermes desaparecem do centro da reação inflamatória granulomatosa, agora já nos vasos intra-hepáticos, onde os vermes encaharam, trombosados (Mehlhorn et al., 1981). Assim, são três as principais ações do praziquantel sobre os vermes: contração muscular, lesão do tegumento e alterações metabólicas (Cioli, Pica-Mattocchia & Archer, 1995). Embora não haja dúvidas da importância do íon  $Ca^{2+}$  como mediador na ação direta ou indireta destes efeitos, não se sabe por que o fluxo de  $Ca^{2+}$  ocorre (Webbe & James, 1977; Day, Bennett & Pax, 1992). Para Cioli, Pica-Mattocchia & Archer (1995), a esteroespecificidade do praziquantel é um argumento indicativo de que a droga interage com alguma proteína do parasito que regula os fluxos de  $Ca^{2+}$ .

### Associação de Drogas

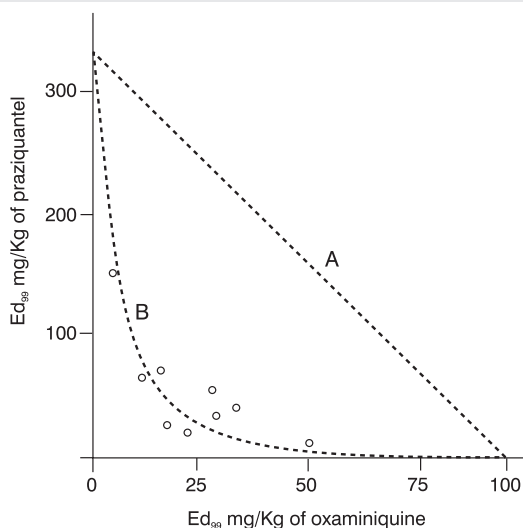
A tentativa de associar dois agentes antiesquistossomóticos tem como objetivos: diminuir a dose de cada droga administrada individualmente (visando diminuir efeitos tóxicos e colaterais), aumentar o índice terapêutico, baixar o custo do tratamento e evitar o aparecimento de cepas resistentes.

São vários os estudos feitos utilizando-se diferentes drogas que apresentaram atividade parcial contra os esquistossomos, mas aqui serão discutidos apenas os resultados obtidos da associação entre oxamniquine e praziquantel, duas drogas que vêm sendo largamente empregadas na clínica e em programas de controle da esquistossomose, com poucos efeitos tóxicos e boa atividade terapêutica.

Para avaliação da atividade aditiva ou sinérgica de drogas, deve-se seguir o desenho experimental utilizado por Shaw & Brammer (1983). Resumindo, estes autores utilizaram, como modelos, camundongos infectados por *S. mansoni* e trataram os diferentes grupos de animais com doses crescentes de oxamniquine ou praziquantel, isoladamente ou em associação. Após 14 dias, os animais foram sacrificados e a porcentagem do número de vermes que estava encapsulada no fígado foi calculada. Foi considerado o valor de ED99 definido como a dose total de droga necessária para matar 99% dos vermes

machos (Gráfico 2). Após a análise de regressão dos dados, ficou demonstrado que a associação da oxamniquine com o praziquantel produziu ação sinérgica.

Gráfico 2 – Efeito antiesquistossomótico de oxamniquine e praziquantel, administrados sozinhos e em associação. Os pontos (o) indicam o valor de  $ED_{99}$  da oxamniquine (abscissa) e do praziquantel (ordenada) ou em várias combinações das duas. Para revelar efeito aditivo, espera-se que os pontos estejam na linha A



Fonte: Shaw & Brammer (1983).

Esse estudo experimental foi confirmado por ensaio realizado no Malawi, África, numa população com infecção mista (*S. mansoni* e *S. hematobium*, com predominância de *S. hematobium*), utilizando doses menores de oxamniquine e praziquantel que aquelas utilizadas comumente (Pugh & Teesdale, 1983). Ensaios clínicos posteriores nem sempre confirmaram esses resultados tão promissores (Utzing et al., 2003).

Uma nova associação de drogas, praziquantel e arteméter, tem sido recentemente proposta. Essa associação permitiria matar os vermes imaturos e os maduros (Xiao et al., 2002).

## DROGAS PROFILÁTICAS

### Derivados da Artemisina

A artemisina, uma lactona sesquiterpênica com um grupo peróxido, é o princípio ativo obtido das folhas de *Artemisia annua*. Essa planta tem sido utilizada há mais de dois mil anos para tratamento de febre na China e, a partir da década de 1970, a artemisina e derivados, especialmente o arteméter e o artesunato, foram utilizados amplamente como antimaláricos.

A atividade antiesquistossomótica da artemisina, do arteméter e do artesunato foi descrita no início da década de 1980, na República Popular da China, inicialmente com *S. japonicum*. Posteriormente, ficou demonstrado que a artemisina e seus compostos possuem atividade contra as três principais espécies que parasitam o homem (Utzing et al., 2003; Xiao et al., 2002; Araújo, Kohn & Katz, 1991).

É interessante salientar que, diferentemente da oxamniquine e do praziquantel, a atividade do arteméter é maior nas formas jovens do que nos vermes adultos (Xiao et al., 2002).

No Brasil, o arteméter e o artesunato foram ensaiados em camundongos e *hamsters* experimentalmente infectados pela cepa LE de *S. mansoni* em infecções maduras (45 dias após inoculação) (Araújo, Kohn & Katz, 1991, 1999). O arteméter (solução oleosa do éter 12-metil da hidroartemisina) mostrou acentuada atividade esquistossomicida na dose única de 100 mg/kg por via intramuscular (100% de alteração do oograma e 61,5% dos vermes mortos no fígado). Já a mesma dose por via oral não produziu alteração do oograma e originou apenas 22,6% de vermes mortos no fígado. Quando os camundongos foram tratados com 100 mg/kg/dia por cinco dias, im, o percentual de vermes mortos chegou a 96,3%. Camundongos tratados com 200 mg/kg x 1, im e examinados 45 dias depois, mostraram que os vermes sobreviventes retomaram totalmente a sua capacidade de oviposição (Araújo, Kohn & Katz, 1991).

Os resultados do ensaio com o artesunato, em dose única oral, de 300 ou 500 mg/kg, ou durante cinco dias consecutivos, 45 dias após a infecção, mostraram diferenças significativas na distribuição e na mortalidade dos vermes e na alteração do oograma nos animais tratados, quando comparados ao controle, trinta dias após o tratamento. Quando os animais foram sacrificados, sessenta ou noventa dias após o tratamento, as diferenças entre os grupos, tratado e de controle, foram desaparecendo, mostrando que os vermes sobreviventes se recuperaram voltando para seu hábitat normal, os vasos mesentéricos, e reiniciaram a postura de ovos (Araújo, Kohn & Katz, 1999).

O arteméter produz deslocamento dos vermes para o fígado, que começa oito horas após a administração da droga e se completa no sétimo dia (Xiao & Catto, 1989). Após o tratamento, foi observado que os vermes adultos apresentam redução significativa do glicogênio (Xiao, Hotez & Tanner, 2000) e, embora apareça lentamente, há extensa e grave lesão do tegumento (Xiao et al., 2002). Também foram descritas alterações no aparelho reprodutor feminino, com diminuição do volume ovariano e rarefação dos folículos vitelínicos (Araújo, Kohn & Katz, 1999).

*In vitro*, a exposição dos vermes ao arteméter não revelou nenhuma atividade sobre os mesmos; todavia, quando foi acrescentada hemina, a atividade letal se manifestou. Parece, portanto, que o arteméter é ativado pela hemina, que faz a clivagem da ponte de endoperoxidase, gerando radicais livres que devem se ligar de forma covalente a proteínas específicas dos vermes (Xiao et al., 2001).

A associação de arteméter (150 mg/kg) e praziquantel (75 mg/kg) foi usada em *hamsters* infectados por formas jovens e adultas de *S. mansoni*. As drogas foram administradas simultaneamente ou com intervalos de horas ou de até sete dias. Os resultados mostraram que houve diminuição significativa do número de vermes com esta associação maior do que a obtida com o praziquantel isoladamente (Utzinger et al., 2003).

Por apresentar atividade acentuada contra os vermes imaturos, o arteméter vem sendo ensaiado, em áreas endêmicas, como droga profilática na esquistossomose, conforme será discutido adiante quando for abordada a terapêutica clínica.

## DROGAS SUPRESSORAS

Drogas que têm ação específica sobre a oviposição da fêmea de *S. mansoni* têm sido descritas.

De fato, Campbell & Cuckler (1967) demonstraram que o nicarbazin, quando adicionado à dieta de camundongos, na concentração de 0,2%, não matava os vermes de *S. mansoni*, mas interrompia a

oviposição já a partir do segundo dia. A retirada dessa dieta permitia que as fêmeas retomassem completamente a sua capacidade de realizar a oviposição (Campbell & Cuckler, 1967). Esses dados foram confirmados por Pellegrino & Katz (1969). Todavia, a administração de até 1.000 mg/kg/dia por cinco dias consecutivos, por via oral, em camundongos infectados, mostrou-se totalmente inativa. Já em dois macacos *Cebus* tratados, por via oral, com dose de 400 mg/kg/dia por dois dias, seguida por 200 mg/kg/dia por dez dias, foi observada, por intermédio de curetagens retais seriadas, uma interrupção temporária da postura (Pellegrino & Katz, 1969).

Também a thiosinamina e a sulfona-mãe (diaminodifenilsulfona – DDS) foram ativas para a interrupção temporária da postura (Pellegrino, Katz & Dias, 1972; Pellegrino & Katz, 1975).

Agentes esterilizantes de roedores machos, bem como substâncias antifertilizantes, também têm essa atividade (Davies & Jackson, 1970).

Mais recentemente, foram publicados os resultados obtidos com um inibidor da síntese de colesterol, mevinolina, que, administrado a camundongos, bloqueou a produção de ovos de *S. mansoni*. Essa mesma droga, acrescentada a 2% na ração de camundongos infectados por *S. mansoni*, eliminou 96%-100% dos vermes adultos quando administrada por 14 dias e mais de 90% quando administrada por dois dias antes e 15 dias depois da infecção (Vandewaa et al., 1989).

A lovastatina, uma lactona (a forma inativa do ácido hidroxílico aberto), é também um potente inibidor da síntese endógena do colesterol. Essa droga foi ensaiada em camundongos infectados por *S. mansoni*, trinta dias após a infecção. Com as doses maiores (400 mg/kg/dia por um a cinco dias) por gavagem, foram observadas, trinta dias após o término do tratamento, alteração do oograma em respectivamente 20% e 42,9% dos animais tratados, bem como a presença de vermes mortos no fígado em 14,8% e 21,8%. Nos animais de controle (no caso, não tratados), não foram detectadas alterações do oograma, nem vermes mortos. Em outro experimento, quando os animais com infecção de trinta dias foram tratados por gavagem, com a dose de 400 mg/kg/dia por cinco dias consecutivos e sacrificados em diferentes períodos pós-tratamento, foi visto que a ação sobre a alteração do oograma apareceu no 15º dia, quando também já havia um pequeno percentual de vermes mortos que foi aumentado aos trinta e sessenta dias. Mesmo dois meses após o tratamento, o efeito da droga persistia na maioria das fêmeas, no que se refere à parada da oviposição, inclusive com baixa acentuada do número de ovos no fígado dos animais tratados. Ao microscópio, foram observadas alterações degenerativas nos vermes, tendo as principais acometido o aparelho reprodutor, com a redução e alteração dos folículos vitelínicos e do ovário das fêmeas e modificações nos testículos dos machos (Araújo et al., 2002). Essas drogas anticolesterolêmicas ainda não foram, mas deveriam ser, ensaiadas na clínica como agentes antiesquistossomose.

## RESISTÊNCIA A DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS

Diferentes isolados e/ou cepas têm mostrado susceptibilidade maior ou menor (medida por mortalidade dos vermes em relação à mesma dose do medicamento utilizado no mesmo hospedeiro experimental), sejam cepas oriundas de uma mesma área ou região geográfica ou mesmo oriundas de diferentes indivíduos numa mesma comunidade.

Essas diferenças aparecem independentemente de esses indivíduos terem sido tratados ou não com quimioterápicos específicos, anteriormente. Na realidade, devem-se considerar dois conceitos importantes:

o da tolerância e o da resistência. Fala-se em tolerância quando uma cepa do verme, que nunca havia entrado em contato com a droga específica, apresenta resposta quimioterápica diminuída significativamente em relação a uma cepa padronizada de laboratório. Trata-se de resistência quando a falta da resposta aparece nos descendentes daqueles vermes que sobreviveram ao tratamento (Coles et al., 1986).

Por outro lado, essas definições não devem ser confundidas com falha terapêutica. De fato, as causas de falha terapêutica podem ser várias, dependendo dos fatores do hospedeiro (humano ou animal) que podem influenciar na resposta à droga, tais como: absorção da droga, metabolização, idade, sexo, associações mórbidas, fase da infecção, diferença entre cepas de animais de laboratório ou fatores do parasito, estágio evolutivo, balanço de sexos, ou mesmo diferente susceptibilidade à droga.

Portanto, a demonstração de resistência (ou susceptibilidade) deve ser feita em laboratório, mediante o tratamento de animais (camundongos) infectados com o isolado (ou cepa) de *S. mansoni* que se quer estudar, isso enquanto não se consegue um marcador (bioquímico ou molecular) que poderia vir a facilitar, e muito, a identificação dos vermes resistentes.

Desde a década de 1950, sabe-se que cepas de *S. mansoni* diferem na sua resposta ao tratamento às mesmas drogas. De fato, foi demonstrado que a cepa de *S. mansoni* do Egito mostrou-se seis vezes menos susceptível ao tratamento com miracil D do que a cepa da Libéria (Gönnert & Vogel, 1955). Em 1971, Rogers e Bueding relataram que camundongos infectados com uma cepa de *S. mansoni* proveniente de Porto Rico, quando tratados com hycanthone (60 mg/kg, im) apresentaram apenas parada temporária da postura, pois 12 meses após o tratamento todos os animais apresentavam ovos viáveis no fígado. Esses ovos foram colocados para eclodir e completaram o ciclo evolutivo normalmente. Camundongos infectados com essa descendência de vermes mostraram-se totalmente resistentes à ação do hycanthone (Rogers & Bueding, 1971). Utilizando-se de outros isolados e seguindo a mesma metodologia antes descrita, outros autores não obtiveram cepa resistente (Yarinsky et al., 1974; Dias & Oliver, 1986). Katz, Dias & Araújo (1973), pela primeira vez, descreveram cepas resistentes provenientes de dois pacientes tratados por duas vezes com hycanthone e que continuavam eliminando ovos de *S. mansoni* nas fezes. Fechado o ciclo com miracídios provenientes desses pacientes, foi possível mostrar experimentalmente em camundongos que essas cepas eram resistentes ao hycanthone e também menos susceptíveis ao niridazol e à oxamniquine.

Estudos posteriores realizados no Brasil, Egito, Quênia e Senegal não só confirmaram o encontro de cepas resistentes após o tratamento, mas também encontraram cepas tolerantes aos agentes esquistossomicidas oxamniquine ou praziquantel (Dias et al., 1978; Stelma et al., 1995). Também em laboratório foi possível obter uma cepa de *S. mansoni* altamente resistente partindo de um *pool* de isolados de diferentes regiões e tratando-os com praziquantel por sete vezes sucessivas (Fallon & Doenhoff, 1994).

Estudos bioquímicos e genômicos têm sido realizados comparando-se cepas resistentes e susceptíveis. Foi observado que a oxamniquine funciona como substrato para a sulfotransferase, que está presente nos esquistossomos susceptíveis, mas ausente nos vermes resistentes. Por outro lado, a inibição da síntese de ácidos nucléicos é irreversível nos vermes susceptíveis, mas apenas temporária nos vermes resistentes, e esta parece ser a principal ação da droga para a mortalidade dos vermes (Cioli, Pica-Mattoccia & Archer, 1995). Brindley et al. (1989) descreveram uma modificação genômica, caracterizada pela presença de polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição, no DNA do verme de uma cepa resistente ao hycanthone. Esta modificação foi vista em uma em cada cem cópias do RNA ribossomal e é resultante de uma inserção de 732 nucleotídeos duplicados no gene do verme resistente (Brindley et al., 1989, 1991).

Esse achado não foi confirmado em outras cepas (Vieira et al., 1991), mas o estudo do polimorfismo genético de diferentes isolados e cepas poderá contribuir para a obtenção de um marcador de resistência a drogas (Dias Neto et al., 1993).

Trabalho muito informativo foi publicado por Cioli et al. (2004), mostrando os resultados obtidos, em três diferentes laboratórios (Roma, Itália; Gisa, Egito; e Bangor, Inglaterra), com nove diferentes isolados de *S. mansoni* em camundongos experimentalmente infectados e tratados com praziquantel. Quatro desses isolados não haviam tido contato prévio com a droga, e cinco já haviam demonstrado, em ensaios anteriores, resistência ao praziquantel, seja por indução e/ou seleção após tratamentos repetidos dos animais, seja por terem sido isolados de pacientes que não se curaram. Administração da ED<sub>50</sub> (dose que mata 50% dos vermes adultos) foi feita em camundongos tratados com praziquantel nas doses totais de 125, 250, 500 e 1.000 mg/kg, divididas em cinco doses, administradas por cinco dias consecutivos e em infecções com 49 dias. Os animais foram sacrificados duas semanas após o último dia de tratamento. Nas cepas consideradas susceptíveis, a ED<sub>50</sub> estava sempre abaixo de 100 mg/kg (média de 70), enquanto nas resistentes presumíveis estava sempre acima de 100 mg/kg (média de 209), ou seja, uma diferença de três vezes entre os dois grupos de isolados.

Embora a diferença de resposta ao praziquantel tenha sido inquestionável e significativa, os autores concluem que a expectativa é que a droga continue útil por um longo período, ao contrário de outras drogas antiparasitárias, aí incluída a oxamniquine, pois o praziquantel, mesmo após vinte tratamentos consecutivos, teve apenas aumento de no máximo três vezes a dose curativa (Cioli et al., 2004).

## REFERÊNCIAS

- ANDREWS, P. et al. Praziquantel. *Medical Research Review*, 3: 147-200, 1983.
- ARAUJO, N.; KOHN, A. & KATZ, N. Activity of the artemether in experimental schistosomiasis mansoni. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86, supl. 2: 185-188, 1991.
- ARAUJO, N.; KOHN, A. & KATZ, N. Therapeutic evaluation of artesunate in experimental *Schistosoma mansoni* infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 32: 7-12, 1999.
- ARAUJO, N. et al. *Schistosoma mansoni*: ação da lovastatina no modelo murino. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 35: 35-38, 2002.
- BAXTER, C. A. R. & RICHARDS, H. C. Schistosomicides. 1. Derivatives of 2-aminomethyl-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoline. *Journal of Medicinal Chemistry*, 14: 1.033-1.042, 1971.
- BECKER, B. et al. Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica* (Trematoda) *in vitro*. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 63: 113-128, 1980.
- BERBERIAN, D. A. & FREELE, H. Chemotherapeutic Effect of Antischistosomal Drugs in experimentally induced *Schistosoma mansoni* infections in swiss mice and syrian hamsters. *The Journal of Parasitology*, 50: 435-440, 1964.
- BRENER, Z. Quimioterapia da esquistossomose experimental. II Observações sobre a atividade terapêutica do cloridrato de glucosamina. *O Hospital*, 57: 1.069-1.073, 1960.



- BRINDLEY, P. J. et al. Characterization of a programmed alteration in an 18S ribosomal gene that accompanies the experimental induction of drug resistance in *Schistosoma mansoni*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 88: 7.754-7.758, 1991.
- BRINDLEY, P. J. & SHER, A. The chemotherapeutic effect of praziquantel against *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response. *Journal of Immunology*, 139: 215-220, 1987.
- BRINDLEY, P. J. et al. A genomic change associated with the development of resistance to hycanthon in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 34: 99-108, 1989.
- BUEDING, E. & PENEDO, N. Effects of alkylidibenzylamines on *Schistosoma mansoni*. *Federation Proceedings of the American Society of Experimental Biology*, 16: 286, 1957.
- CAMPBELL, W. C. & CUCKLER, A. C. Inhibition of egg production of *Schistosoma mansoni* in mice treated with nicarbazin. *The Journal of Parasitology*, 53: 977-980, 1967.
- CANÇADO, J. R. et al. Evaluation of the treatment of human *Schistosoma mansoni* infection by the quantitative oogram technique. *Bulletin of the World Health Organization*, 33: 557-566, 1965.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. & ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present and future? *Pharmacology & Therapeutics*, 68: 35-85, 1995.
- CIOLI, D. et al. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *International Journal for Parasitology*, 34: 979-987, 2004.
- COELHO, P. M. Z.; MELLO, R. T. & GERKEN, S. E. *Schistosoma mansoni*: evaluation of the activity of oxamniquine on schistosomules, at 24 hours after infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 15: 557-561, 1993.
- COELHO, P. M.; LIMA E SILVA, F. C. & NOGUEIRA-MACHADO, J. A. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* strain isolated from patient submitted to repeated treatments. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 39: 101-106, 1997.
- COLES, G. C. et al. Drug resistance in schistosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 347, 1986.
- COLES, G. C. et al. Tolerance of Kenyan *Schistosoma mansoni* to oxamniquine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 782-785, 1987.
- CONCEIÇÃO, M. J.; ARGENTO, C. A. & CORREA, A. Study of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with failure of treatment with oxamniquine. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95: 375-380, 2000.
- DAVIES, P. & JACKSON, H. Experimental studies on the chemosterilization of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 61: 167-176, 1970.
- DAY, T. A.; BENNETT, J. L. & PAX, R. A. Praziquantel: the enigmatic antiparasitic. *Parasitology Today*, 8: 342-344, 1992.
- DIAS, L. C. S. & OLIVER, C. E. Failure at inducing resistance to schistosomicidal drugs in Brazilian human strain of *Schistosoma mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 28: 352-357, 1986.
- DIAS, L. C. S.; PEDRO, R. J. & DEBELARDINI, E. R. Use of praziquantel in patients with schistosomiasis mansoni previously treated with oxamniquine and for hycanthon: resistance of *Schistosoma mansoni* to schistosomicidal agents. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 652-659, 1982.

- DIAS, L. C. et al. A human strain of *Schistosoma mansoni* resistant to schistosomicides. *Revista de Saúde Pública*, 12: 110, 1978.
- DIAS NETO, E. et al. The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 57: 83-88, 1993.
- DOENHOFF, M. J. et al. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 947-951, 1987.
- DRESCHER, K. M. et al. Response of drug resistant isolates of *Schistosoma mansoni* to antischistosomal agents. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88: 89-95, 1993.
- FALLON, P. G. & DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 51: 83-88, 1994.
- FOSTER, R. The preclinical development of oxamniquine. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 15: 1-9, 1973.
- FOSTER, R. & CHEETHAM, B. L. Studies with the schistosomicide oxamniquine (UK-4271). I. Activity in rodents and *in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 67: 674-684, 1973.
- FOSTER, R.; CHEETHAM, B. L. & KING, D. F. Studies with the schistosomicide oxamniquine (UK-4271). II. Activity in primates. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 67: 685-693, 1973.
- FOSTER, R. et al. The control of immature *Schistosoma mansoni* in mice by UK 3883, a novel 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivative. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 65: 221-232, 1971a.
- FOSTER, R. et al. The action of UK 3883, a novel 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivative, against mature schistosomes in rodents and primates. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 65: 59-70, 1971b.
- GÖNNERT, R. Schistosomiasis studies. II. Übedie Eibildung bei *Schistosoma mansoni* und das Schicksal der Eier Wirtsorganismus. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, 6: 33-52, 1955.
- GÖNNERT, R. & ANDREWS, P. Praziquantel, a new board-spectrum antischistosomal agent. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 52: 129-150, 1977.
- GÖNNERT, R. & VOGEL, H. Dependence on host and parasite strain of the successful therapy of experimental schistosomiasis. *Zeitschrift für Tropenmedizin und Parasitologie*, 6: 193-198, 1955.
- ISMAIL, M. et al. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60: 932-935, 1999.
- KAYE, B. & WOOLHOUSE, W. M. The metabolism of a new schistosomicide 2-isopropylaminomethyl-6-methyl-7-nitro-1, 2, 3, 4-tetrahydroquinoline (UK 3883). *Xenobiotica*, 2:169-178, 1972.
- KATZ, N. & PELLEGRINO, J. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. *Advances in Parasitology*, 12: 369-390, 1974a.



- KATZ, N. & PELLEGRINO, J. Studies of various aspects of schistosomiasis mansonii in *Cebus* monkeys using the quantitative oogram method. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 16: 245-252, 1974b.
- KATZ, N.; PELLEGRINO, J. & MEMORIA, J. M. Quantitative oogram method in *Cebus* monkeys experimentally infected with *Schistosoma mansonii*. *The Journal of Parasitology*, 52: 917-919, 1966.
- KATZ, N.; ROCHA, R. S. & CHAVES, A. Preliminary trials with praziquantel in human infections due to *Schistosoma mansonii*. *Bulletin of the World Health Organization*, 57: 781-785, 1979.
- KATZ, N. et al. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansonii* resistente a agentes esquistossomicidas. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 7: 381-387, 1973.
- KHAYYAL, M. T. Significance of worm shifts in experimental schistosomiasis mansonii, with emphasis on the action of anaesthetics. *Nature*, 27: 1.331-1.332, 1965.
- KOHN, A. et al. Ação da oxamniquine sobre o *Schistosoma mansonii* em camundongos experimentalmente infectados. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 21: 217-227, 1979.
- MEHLHORN, H. et al. *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansonii*. A light and electron microscopic study. *Arzneimittel-Forschung*, 31: 544-554, 1981.
- PELLEGRINO, J. & KATZ, N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansonii. *Advances in Parasitology*, 6: 233-290, 1968.
- PELLEGRINO, J. & KATZ, N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis. IV. Oogram studies with nicarbazin, an egg-suppressive agent. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 11: 215-221, 1969.
- PELLEGRINO, J. & KATZ, N. Experimental therapy of schistosomiasis. X. diaminodiphenylsulfone (DDS) in experimental schistosomiasis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 17: 199-205, 1975.
- PELLEGRINO, J.; DE MARIA, M. & FARIA, J. Infection of the golden hamster with *Schistosoma mansonii* cercariae through the cheek pouch. *The Journal of Parasitology*, 51: 1.015, 1965.
- PELLEGRINO, J. & MACHADO, A. Experimental chemotherapy of schistosomiasis. VI –Egg suppressive activity of thiosinamine. *Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas*, 5: 43-45, 1972.
- PELLEGRINO, J.; KATZ, N. & DIAS, E. P. Experimental chemotherapy of schistosomiasis. VII – Laboratory trials with oxamniquine, a new antischistosomal agent. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 15, supl. 1: 10-14, 1973.
- PELLEGRINO, J. et al. New approach to the screening of drugs in experimental *Schistosoma mansonii* in mice. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 11: 201-215, 1962.
- PELLEGRINO, J. et al. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansonii. XIII. Activity of praziquantel, an isoquinoline-pyrazino derivative, on mice, hamsters and *Cebus* monkeys. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 52: 151-168, 1977.
- PICA-MATTOCCIA, L. & CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansonii* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. *International Journal for Parasitology*, 34: 527-533, 2004.

- PRATA, A. Biopsia retal na Esquistossomose Mansônica: bases e aplicações no diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária, 1957.
- PUGH, R. N. & TEESDALE, C. H. Synergy of concurrent low dose of oxamniquine and praziquantel in schistosomiasis. *British Medical Journal*, 287: 877-878, 1983.
- RAISON, C. G. & STANDEN, O. D. The schistosomicidal activity of symmetrical diaminodiphenoxyalkanes. *British Journal of Pharmacology*, 10: 191-199, 1955.
- RICHARDS, H. C. & FOSTER, R. A new series of 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivatives displaying schistosomicidal activity in rodents and primates. *Nature*, 222: 581-582, 1969.
- ROGERS, S. H. & BUEDING, E. Hycanthone resistance: development in *Schistosoma mansoni*. *Science*, 172: 1.057-1.058, 1971.
- SABAH, A. A. et al. *Schistosoma mansoni*: reduced efficacy of chemotherapy in infected T-cell-deprived mice. *Experimental Parasitology*, 60: 348-354, 1985.
- SHAW, J. R. & BRAMMER, K. W. The treatment of experimental schistosomiasis with a combination of oxamniquine and praziquantel. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 39-40, 1983.
- STANDEN, O. D. Chemotherapy of helminthic infections. In: SCHNITZER, R. J. & HAWKING, F. *Experimental Chemotherapy*. New York, London: Academic Press Inc., 1963. v. I
- STELMA, F. F. et al. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53: 167-170, 1995.
- UTZINGER, J. et al. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 47: 1.487-1.495, 2003.
- VANDEWAA, E. A. et al. Physiological role of HGM-CoA reductase in regulating egg production by *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Physiology*, 257: 618-625, 1989.
- VIEIRA, L. Q. et al. Genomic variability in field populations of *Schistosoma mansoni* in Brazil as detected with a ribosomal gene probe. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44: 69-78, 1991.
- WEBBE, G. & JAMES, C. A comparison of the susceptibility to praziquantel of *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. intercalatum* and *S. matthei* in hamsters. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 52: 169-177, 1977.
- WU, M. H. et al. Comparison of the therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levo-praziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of schistosomiasis japonica. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45: 345-349, 1991.
- XIAO, S. H. & CATTO, B. A. Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of racemic praziquantel and its levorotated isomer on *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Infectious Diseases*, 159: 589-592, 1989a.
- XIAO, S. H. & CATTO, B. A. *In vitro* and *in vivo* studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 33: 1.557-1.562, 1989b.
- XIAO, S. H.; HOTEZ, P. J. & TANNER, M. Artemether, an effective new agent for chemoprophylaxis against schistosomiasis in China: its *in vivo* effect on the biochemical metabolism of the Asian schistosome. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 31: 724-732, 2000.

- XIAO, S. et al. Therapeutic effect of praziquantel enantiomers in mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 93: 324-325, 1999.
- XIAO, S. H. et al. Artemether administered together with haemin damages schistosomes *in vitro*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 95: 67-71, 2001.
- XIAO, S. H. et al. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. *Acta Tropica*, 82: 175-181, 2002.
- YARINSKY, A. et al. An 18-month study of the parasitologic and tumorigenic effects of hycanthone in *Schistosoma mansoni*-infected and noninfected mice. *Toxicology and applied Pharmacology*, 27: 169-182, 1974.