

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde  
e Medicina Investigativa**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**INIBIÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE PARASITÁRIO COMO ALVO  
CONTRA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

**RAFAEL LIMA COSTA**

**Salvador -Brasil  
2014**

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISA GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde  
e Medicina Investigativa**

**INIBIÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE PARASITÁRIO COMO ALVO  
CONTRA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA**

**RAFAEL LIMA COSTA**

**ORIENTADOR: Dr. Marcos André Vannier Dos Santos**

Dissertação apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em  
Biotecnologia em Saúde e Medicina  
Investigativa para obtenção do Grau  
de mestre em ciências.

**Salvador -Brasil  
2014**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Costa, Rafael Lima

C837i Inibição do sistema antioxidante parasitário como alvo contra *Esquistossomose mansônica*/ Rafael Lima Costa. - 2014.

66f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Marcos André Vannier dos Santos, Laboratório de Biomorfologia Parasitária.

Dissertação (mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Tratamento. 3. Cloroquina. 4. Dietilditiocarbamato I. Título.  
CDU 616.995.122

“INIBIÇÃO DO SISTEMA ANTIOXIDANTE PARASITÁRIO COMO ALVO CONTRA  
ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA”

**RAFAEL LIMA COSTA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dr. Zilton de Araújo Andrade  
Pesquisador  
CPqGM/FIOCRUZ



---

Dr. Artur Gomes Dias Lima  
Professor Titular  
UNEB



---

Drª. Milena Botelho Pereira Soares  
Pesquisadora Titular  
CPqGM/FIOCRUZ

Dedico meu trabalho a Deus, a vida e a minha família, tudo que sou e a vontade de ser. Dedico a minha busca e o meu crescer, o caminho que sigo, e como este, os passos que piso.

## AGRADECIMENTOS

Primeiro a Ele, por isso e por tudo.

A minha mãe por seu carinho e paciência, meu pai pelo seu silêncio e honestidade.

A minha irmã por seu exemplo e sua caçulice.

As minhas famílias pelo o amor que me dedicam e dor que compartilham.

Aos meus amigos por serem verdadeiros irmãos.

Ao meu Professor Dr. Marcos André Vannier dos Santos, pela sua paciência, dedicação e sabedoria, durante todo esse tempo.

Ao LBP de hoje e de outros tempos: Ana Lúcia, Daniel, Diego, Diogo, Eliete, Fernanda, Tayane, Vanessa, Ana Paula, Bete, Bruno, Carla, Danielle, Eliomara, Edson, Gustavo, Karla, Thiara, e Rafael Gomes pela ajuda sempre disponível e pelas risadas.

À Adriana Rangel, Cláudio Figueira e Cláudia pela ajuda e esclarecimentos na UME.

Aos amigos e colegas de outros laboratórios por preencherem a xícara sempre que possível, em especial ao seu Antônio do LAPEX, sem sua disponibilidade o trabalho não seria.

Aos grandes amigos dessa luta, Ciro, Ebenézer e Mateus pelos puxões de orelhas e palavras de incentivo.

Aos professores e coordenação da PgBSMI.

Às funcionárias da Biblioteca Eurydice Pires de Sant'Anna, principalmente a D. Fiscina pelo seu empenho em auxiliar alunos perdidos em normas e formatações textuais.

A todos os funcionários do Centro que colaboraram na realização deste trabalho.

Ao CPqGM, CAPES e CNPq por toda estrutura e recursos financeiros que nos auxiliaram

E por último a minha esposa, por sua paciência, fé e sorriso terapêutico.

“Tudo o que eu sei, somente sei  
porque eu amo.”

*Liev Tolstói*

LIMA-COSTA, Rafael. Inibição do Sistema Antioxidante Parasitário como Alvo contra Esquistossomose mansônica. 66 f. il. Dissertação (Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

## RESUMO

A OMS estima que mais de 200 milhões de pessoas estejam infectadas por *Schistosoma sp.* no mundo, sendo que menos de 10% dessa população recebe tratamento adequado. No Brasil, a esquistossomose mansônica é endêmica na maioria dos estados, o número de casos confirmados aumentou mais de 100 vezes entre 1995 e 2010 segundo o Ministério da Saúde. Dentre os estados brasileiros, a Bahia apresenta maior área endêmica. Atualmente o tratamento é realizado pela administração de praziquantel e oxamniquina, porém existem relatos de redução da eficácia e resistência a estes fármacos o que aumenta a necessidade por novas drogas e regimes terapêutico. Uma possibilidade nesta busca corresponde a combinação de substâncias, desse modo o emprego de drogas quinolínicas que impedem a detoxificação do heme aliado à inibição do sistema antioxidante do parasito, devem aumentar os efeitos deletérios deste metabólito. Então, com objetivo de avaliar o efeito *in vitro* da cloroquina (CLQ – cristalização do heme) frente aos vermes adultos do *Schistosoma mansoni*, bem como do dietilditiocarbamato de sódio (DDC - inibidor da superóxido dismutase) tanto isoladas como combinadas. Para isso a citotoxicidade das drogas foi avaliada pela redução de MTT na cultura de esplenócitos, enquanto a atividade esquistossomicida foi determinada pela sobrevida de vermes adultos na presença das substâncias. Os danos na estrutura do parasito foram avaliados por microscopia eletrônica, enquanto os mecanismos de ação foram investigados pela inibição da formação de cristais de heme, bem como o aumento do estresse oxidativo por meio da avaliação da peroxidação lipídica e atividade da SOD. Desse modo, não observou-se toxicidade significativa pela CLQ e DDC em esplenócitos, e a dose efetiva para morte de 50% dos vermes (ED50) foi 24,3µM para CLQ e 63,1µM para DDC. A combinação das drogas foi mais efetiva na proporção de 4 unidades de CLQ para 1 de DDC, e avaliação ultraestrutural dos parasitos submetidos a esse tratamento evidenciou perda do tegumento, assim como na composição do trato digestório. As investigações bioquímicas realizadas demonstraram que esta proporção aumenta a peroxidação lipídica e inibe a formação de hemozoína drasticamente. Estes resultados apontam para uma nova possibilidade terapêutica para esquistossomose, que pode auxiliar no controle desta doença e no impacto social e econômico que provoca.

**Palavras-chave:** *Schistosoma mansoni*, Tratamento, Cloroquina, Dietilditiocarbamato



LIMA-COSTA, Rafael. Inhibition of Parasite Antioxidant System as Target against Schistosomiasis mansoni. 66 f. il. Thesis (Master's Degree) - Oswaldo Cruz Foundation, Research Center Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

#### ABSTRACT

The WHO estimates that 200 millions of people are with *Schistosoma sp.* in the world, where less than 10% of this population receive appropriate treatment. In Brazil, the mansoni schistosomiasis is endemic in vast area most states, the confirmed cases number augmented more than 100-fold between 1995 and 2010 according the Ministry of Health. Among the brazilian states, Bahia is the one with the greatest endemic area. Currently, the treatment is performed with praziquantel and oxamniquine, however there is reports efficacy reduced and resistance to these drugs. That increased the need for new drugs and therapeutic regimens to prevent the selection of resistant strains. A way into this quest is the combination of substances, thus use of quinoline drugs that stop heme detoxification, associated to inhibitors of antioxidant system of parasite, it's may increases of deleterious effects of this metabolite. So, aiming to assess *in vitro* chloroquine effect (CLQ – inhibitor of heme aggregation) against to adult worms of *Schistosoma mansoni*, and sodium diethyldithiocarbamate (DDC - superoxide dismutase inhibitor), thus isolated as combined. The cytotoxicity was assess of MTT reduction in splenocytes cell culture, while the schistosomicide activity was define for survival of worms in presence of substances isolated and associated. The structure damages of parasite were evaluated by electronic microscopy, as mechanism of action were explored by inhibition of heme crystals formation, as well as increase oxidative stress via liperoxidation analysis and SOD activity. This way, not found significant toxicity by CLQ and DDC in splenocyte and effective dose lethal to 50% of worms (ED50) was 24.3 $\mu$ M to CLQ and 63.1 $\mu$ M DDC. The combination of drugs was more effective at ratio of 4 units of CLQ to 1 of DDC, and ultrastructure evaluation undergoing this treatment showed lost parasite tegument, as the composition of digestive tract. Biochemical investigations carried out have shown this proportion increases liperoxidation and inhibits hemozoin formation drastically. This data indicate a new therapeutic possibility to schistosomiasis that will help to fight with the economic and social impact of this disease.

**Keywords:** Schistosoma mansoni, Treatment, Chloroquine, Diethyldithiocarbamate.

## LISTA DE ABREVIATURAS

A.C.	–	Antes de Cristo
CD4 <sup>+</sup>	–	Marcado fenotípico de linfócitos T (55kDa da superfamília Ig)
CEUA	–	Comitê de Ética no Uso Animal
CLQ	–	Cloroquina
CPqGM	–	Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz
CT-SOD	–	Superóxido Dismutase citosólica
D.C.	–	Depois de Cristo
DDC	–	Dietilditiocarbamato de sódio
DAPI	–	Diamidinofenilindol
DMSO	–	Dimetilsulfóxido
DNA	–	Ácido Desoxiribonucléico
ERO	–	Espécies Reativas de Oxigênio
ED50	–	Dose Efetiva capaz de matar 50 %
FIOCRUZ	–	Fundação Oswaldo Cruz
Fe(III)PPIX	–	Ferriprotoporfirina 9
GSR	–	Glutathione redutase
GST	–	Glutathione-S-Transferase
HEPES	–	N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-ácido etano sulfônico
Hz	–	Hemozoína
IFN- $\gamma$	–	Interferon gama
IL-1	–	Interleucina 1
IL-2	–	Interleucina 2
IL-5	–	Interleucina 5
IL-6	–	Interleucina 6
IL-10	–	Interleucina 10
IL-13	–	Interleucina 13
MET	–	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	–	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	–	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
PBS	–	Tampão Fosfato de Sódio
PCE	–	Programa de Controle da Esquistossomose

PRX	–	Peroxirredoxina
PRX 2-Cis	–	Peroxirredoxina com duas cisteínas terminais
PS-SOD	–	Superóxido dismutase associada a membrana
RPMI-1640	–	Meio de cultura 1640 Roswell Park Memorial Institute
Schisto-DB	–	Banco de dados genéticos do <i>Schistosoma sp.</i>
SDS	–	Dodecil sulfato sódio
SESAB	–	Secretária de Saúde do Estado da Bahia
SINAN	–	Sistema Informações de Agravos de Notificação
SIS-PCE	–	Sistema de Informação do Programa de Controle da Esquistossomose
SOD	–	Superóxido dismutase
TGR	–	Tiorredoxina glutaciona redutase
Th1	–	Linfócito T auxiliar um
Th2	–	Linfócito T auxiliar dois
TNF- $\alpha$	–	Fator de necrose tumoral alfa
TRX	–	Tiorredoxina Redutase
WST-1	–	Tetrazolium solúvel em água

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1.1	APECTOS EPIDEMIOLÓGICOS .....	14
1.1.2	Aspectos epidemiológicos na Bahia .....	16
1.2	CICLO EVOLUTIVO .....	17
1.2.1	Ovo .....	18
1.2.2	Miracídio .....	18
1.2.3	Esporocisto .....	19
1.2.4	Cercária .....	19
1.2.5	Esquistossômulo .....	20
1.2.6	Vermes adultos .....	20
1.3	PATOLOGIA .....	21
1.3.1	Fase aguda .....	22
1.3.2	Fase crônica .....	23
1.4	TRATAMENTO .....	24
1.4.1	Oximiquina .....	25
1.4.2	Praziquantel .....	25
1.5	ESTRESSE OXIDATIVO .....	26
1.6	CRISTALIZAÇÃO DO HEME .....	29
1.7	PERSPECTIVAS .....	30
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	31
2.2	OBJETIVO ESPECIFICO .....	31
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>32</b>
3.1	FÁRMACOS .....	32
3.2	ANIMAIS .....	32
3.2.1	Considerações Éticas .....	32
3.3	CITOTOXICIDADE EM ESPLÊNOCITOS .....	32
3.4	INFECÇÃO POR <i>Schistosoma mansoni</i> .....	33
3.5	CURVA DE SOBREVIVÊNCIA <i>IN VITRO</i> .....	33
3.6	MICROSCOPIA ELETRÔNICA .....	34
3.6.1	Microscopia eletrônica de transmissão .....	34
3.6.2	Microscopia eletrônica de varredura .....	34

3.7	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE $\beta$ -HEMATINA <i>IN VITRO</i> .....	34
3.8	INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE HEMOZOINA <i>EX VIVO</i> .....	35
3.9	ATIVIDADE DA SUPEROXIDO DISMUTASE .....	35
3.10	NÍVEL DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA .....	36
3.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	36
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>37</b>
4.1	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM ESPLENOCITOS .....	37
4.2	ANÁLISE DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA <i>IN VITRO</i> .....	39
4.3	EFEITOS OBSERVADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA .....	42
4.3.1	Microscopia eletrônica de varredura .....	42
4.3.2	Microscopia eletrônica de transmissão .....	44
4.4	ANÁLISE DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE HEMOZOINA <i>EX VIVO</i> .....	48
4.5	ANÁLISE DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE $\beta$ -HEMATINA <i>IN VITRO</i> .....	49
4.6	QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUPEROXIDO DISMUTASE .....	50
4.7	QUANTIFICAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA .....	51
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>54</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença infecciosa causada pelo gênero *Schistosoma*. Os machos e as fêmeas deste gênero permanecem em cópula durante a fase adulta e habitam o plexo venoso vesical (*Schistosoma haematobium*) ou mesentérico (*Schistosoma mansoni* e demais espécies), se alimentando de sangue do hospedeiro definitivo. A fêmea realiza a postura de seus ovos que são levados para a luz da bexiga, no caso do *S. haematobium*, enquanto que no *S. mansoni* e demais espécies, os ovos alcançam a luz do intestino. Quando estes encontram alguma coleção hídrica, rompem-se e as larvas liberadas infectam seus hospedeiros intermediários moluscos planorbídeos dos gêneros *Biomphalaria* e *Bulinus* (*S. mansoni* e *S. haematobium*, respectivamente), enquanto o *Schistosoma japonicum* infecta caramujos do gênero *Oncomelania*, que liberam outra forma larvar do trematódeo que infecta os hospedeiros definitivos, dentre estes os seres humanos. Roedores selvagens e animais domésticos acabam servindo de reservatórios para a manutenção e disseminação da doença (GRYSSELS *et al.*, 2006; MODENA, SANTOS-LIMA e COELHO, 2008).

Os primeiros registros médicos da esquistossomose foram identificados pelo Professor Georg Ebers em papiros datados de 1550 A.C. os quais se descrevem sintomas peculiares da esquistossomose provocada pelo *S. haematobium* (DAVID, 2000). Recentemente, foi demonstrada uma prevalência de 45% de antígeno anódico para *Schistosoma* nas múmias da XX Dinastia Egípcia (ZISKIND, 2009). Os primeiros estudos que apresentam evidências da presença do gênero *Schistosoma* na história da humanidade datam de 1910 por Sir M.A. Ruffer que, durante pesquisas em múmias egípcias usando métodos histológicos, encontrou ovos de *S. haematobium* (RUFFER, 1910). Posteriormente, o estudo de cadáveres encontrados na China do período da Dinastia Han (206 A.C – 220 D.C.) demonstrou a presença de ovos de *S. japonicum* (WEI, 1973). Durante trabalho realizado no vale do Nilo, foram encontrados ovos de *S. mansoni* em coprólitos examinados, bem como em outras amostras (HARTER-LAILHEUGUE e BOUCHET, 2006).

Entretanto, em estudos baseados na análise de coprólitos referentes ao período pré-colonial, realizados no Brasil, não se observou a presença de ovos de *Schistosoma* (FERREIRA *et al.*, 1988; CANDANEDO-GUERRA *et al.*, 2003). Estes dados corroboram a teoria da chegada da esquistossomose às Américas por intermédio do tráfico de escravos africanos durante a colonização, bem como pela presença de moluscos suscetíveis ao parasito. Além disso, o fluxo migratório do litoral para o interior também contribuiu para a distribuição da doença pelo continente (COURA e AMARAL, 2004).

## 1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A endemia causada pelo gênero *Schistosoma* acomete uma faixa populacional sob riscos específicos. A esquistossomose é uma doença fundamentalmente de peremptório biológico, mas que apresenta fortes determinantes sociais e culturais para sua dispersão e manutenção (BARBOSA *et al.*, 2008). Avalia-se que mais de 200 milhões de pessoas estejam infectadas pelo mundo, sendo que menos de 10% dessa população recebe tratamento adequado e boa parte deste contingente vive na África (OMS, 2011). Dentre as principais espécies do gênero estão: *S. haematobium*, que causa esquistossomose urinária e ocorre principalmente na África e na península Arábica; *S. japonicum* que está presente na China e alguns países do sudoeste asiático, causando esquistossomose intestinal e hepatoesplênica; e o *S. mansoni*, espécie de maior importância epidemiológica, presente na África, Oriente Médio, Caribe, Suriname, Venezuela e Brasil (GRYSSEELS *et al.*, 2006).

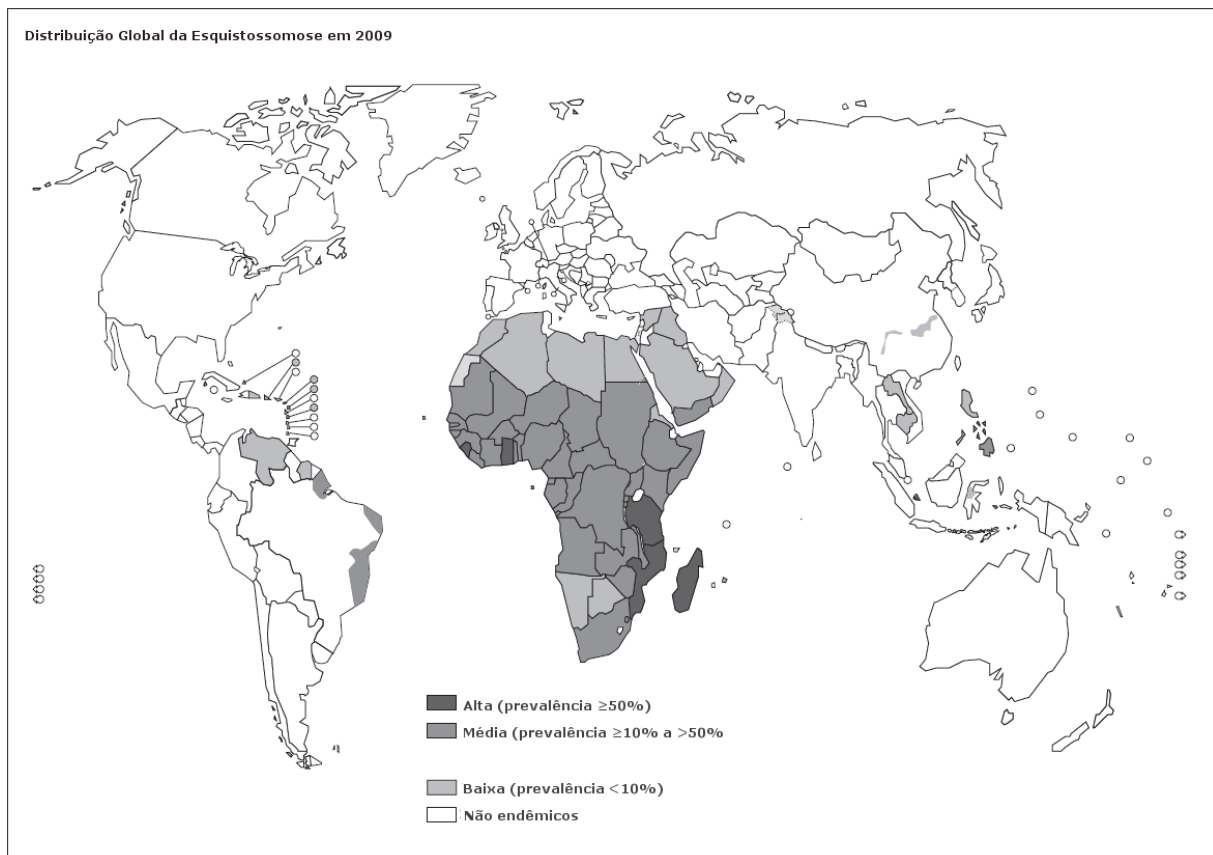


Figura 1: Distribuição e prevalência global da esquistossomose em 2009 segundo a Organização Mundial Saúde.

Fonte: Modificado de OMS, 2011.

A esquistossomose possui um grande impacto social, bem como associações e implicações econômicas, que tem sido evidenciado por alguns trabalhos. Em um estudo prospectivo em 1981, Barbosa e colaboradores demonstraram que trabalhadores rurais com forma grave da doença produziam 35% menos daqueles que apresentavam poucas complicações, estimando-se, inclusive, que o estado de Pernambuco sofria uma perda de 2 milhões de dólares anualmente. Quanto às crianças em idade escolar, a esquistossomose está fortemente associada à anemia, deficiência energética, comprometimento do desenvolvimento físico, bem como da capacidade cognitiva. Esse quadro leva, em longo prazo, a danos na economia local (HOTEZ *et al.*, 2006; KING, 2008; KLOSS, 2008).

No Brasil, a esquistossomose mansônica é endêmica em 19 estados e no Distrito Federal, as áreas de maior endemicidade estão espalhadas desde o litoral nordestino, passando pelo interior da Bahia e chegando ao sudeste de Minas Gerais (COURA e AMARAL, 2004). Configura-se então, um grave problema sanitário, com estimativas de que existam cerca de seis milhões de pessoas infectadas no país (KATZ e ALMEIDA, 2003).

A mortalidade ocorre, principalmente, em decorrência das manifestações clínicas da fase crônica da doença, com base nos dados obtidos no Brasil entre os anos de 1980 e 2003 pelo Programa de Controle da Esquistossomose – PCE (FERREIRA e SILVA, 2007). Estes dados mostraram uma queda de 63,4% na mortalidade entre 1977 e 2003, o qual é acompanhado pela redução dos números de hospitalizações (decréscimo de 77,3%) para o mesmo período (AMARAL *et al.*, 2006).

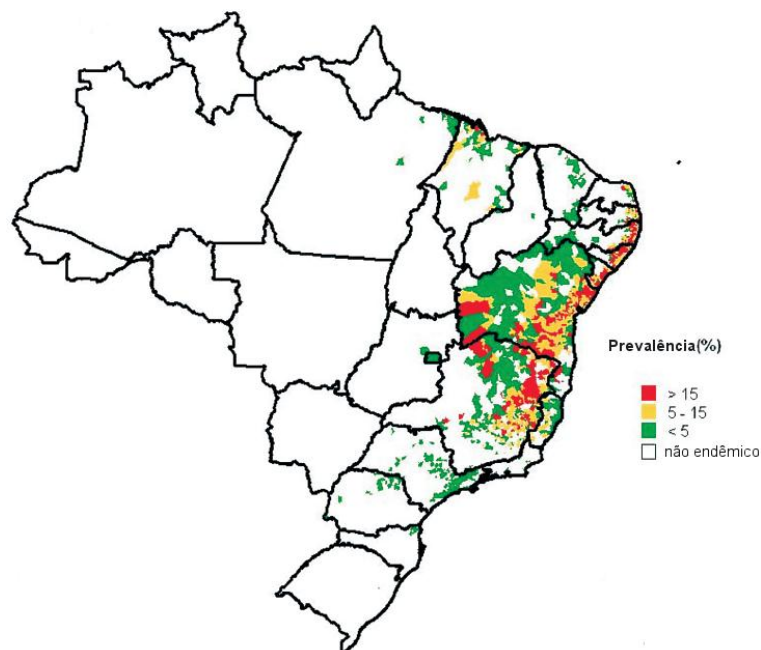


Figura 2: Distribuição da esquistossomose mansônica nos municípios brasileiros em 2003 de acordo com prevalência registrada no PCE. Fonte: Modificado de AMARAL *et al.*, 2006.



### 1.1.1. ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS NA BAHIA

Dentre os estados brasileiros, o território baiano é o que apresenta maior área endêmica (COURA e AMARAL, 2004), pois possui os três principais vetores presentes no Brasil: *Biomphalaria glabrata*; *Biomphalaria tenagophilla*; *Biomphalaria straminea*, sendo a última encontrada em todos os municípios do estado (Secretária de Saúde do Estado da Bahia - SESAB, dados não publicados). Em trabalho publicado por CARMO e BARRETO (1994), observou-se que apesar da constante redução das taxas de prevalência para esquistossomose, municípios do oeste, sudoeste e litoral norte baiano apresentaram aumento, constatando-se o surgimento de novas áreas de transmissão. Novos focos de esquistossomose provavelmente resultam dos fluxos migratórios, bem como da implementação ou incentivo de culturas agrícolas voltadas para o mercado interno, as quais apresentam baixo investimento tecnológico e condições sanitárias precárias, levando a um maior contato do trabalhador com a água para irrigação, quando comparado ao processo produtivo de monoculturas exportadoras (MARTINS e BARRETO, 2003).

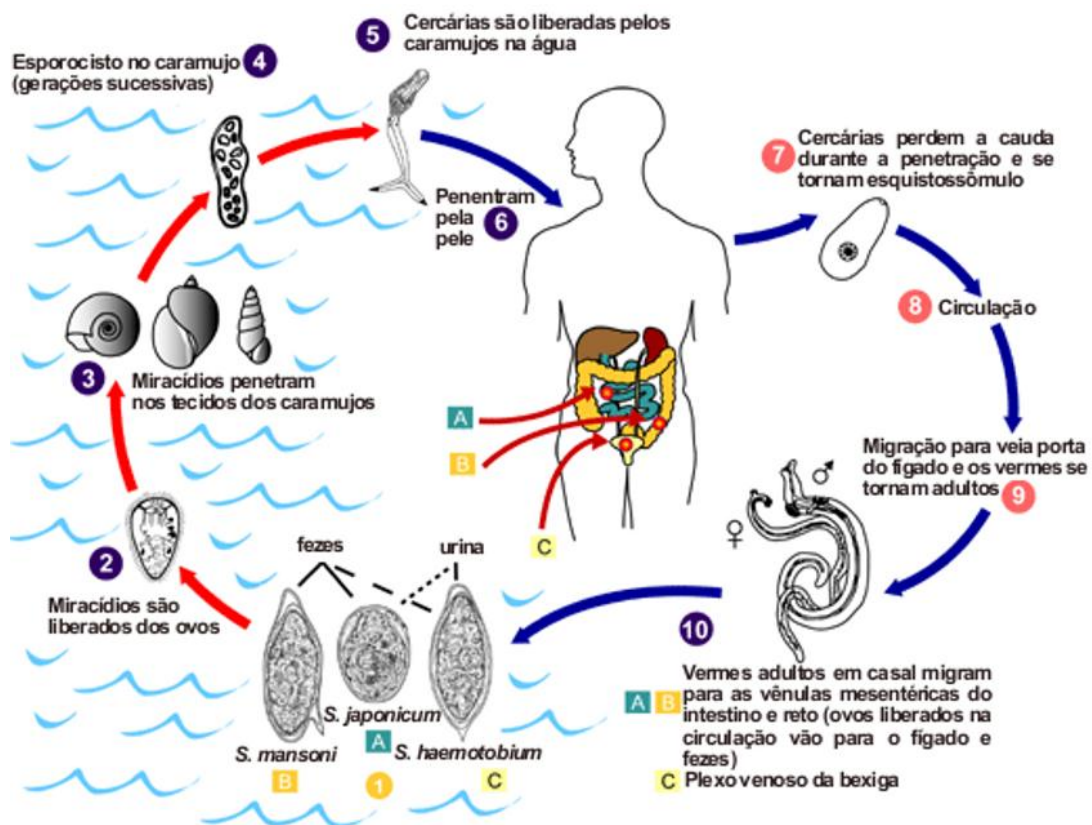
Em 2006 GUIMARÃES e TAVARES-NETO evidenciaram um foco de transmissão em bairro periférico da capital baiana, Salvador. A prevalência entre crianças em idade escolar foi de 30,2%, sendo que destas 9,3%, apresentam alta carga parasitária, constataram também a presença de todos os elementos para manutenção do ciclo biológico do parasito e, de que nenhuma das crianças residia fora da área metropolitana.

Na Bahia, no período de 2004 a 2007, registrou-se no Plano de Controle da Esquistossomose (PCE) a realização de mais de um milhão de exames, desses 53.233 foram positivos (4,6%) e, nesse mesmo tempo, foram tratados 82,7% dos portadores registrados (SAAVEDRA, DANTAS-FILHO e MIRANDA, 2008). De acordo com documentos não publicados da SESAB, a distribuição do Praziquantel, fármaco de primeira escolha para o tratamento da esquistossomose, realizada pelo programa de controle do Ministério da Saúde, não condiz com os dados registrados do SINAN (Sistema de Informações de Agravos de Notificação) e no SIS-PCE (Sistema de Informação do PCE), a distribuição média do medicamento foi 97,5% maior do que o número de exames positivos de 2008 ao primeiro semestre de 2009. Desta maneira, é pode-se inferir a existência de uma subnotificação dos casos de esquistossomose, uma vez que a própria SESAB, no mesmo documento, alertou que muitos municípios baianos não fornecem informações ou o fazem irregularmente ao SIS-PCE e SINAN.

## 1.2. CICLO EVOLUTIVO

Os espécimes do gênero *Schistosoma* são platelmintos trematódeos que pertencem à subclasse Digenea, tratando-se de endoparasitos de simetria bilateral, tendo o tegumento formado por uma dupla membrana de bicamada lipídica, que delimita a superfície de uma estrutura sincicial (DA'DARA *et al.*, 2012). Os hospedeiros intermediários das espécies do gênero *Schistosoma* são moluscos gastrópodes aquáticos principalmente dos gêneros *Biomphalaria*, *Bulinus* ou *Oncomelania*. As espécies do gênero *Schistosoma* se caracterizam por diversos aspectos, dentre os quais: apresentam sexos separados com dimorfismo sexual acentuado; eliminam ovos não operculados com espinho lateral ou terminal e, têm como forma infectante do hospedeiro definitivo a cercária (MACHADO-SILVA, NEVES e GOMES 2008).

Figura 3: Ciclo evolutivo dos principais agentes etiológicos da esquistossomose. 1- Ovos são eliminados com as



fezes ou urina. Em condições adequadas, ocorre o rompimento e saída dos miracídeos (2). Esses infectam grupos específicos de caramujo (3). Nos caramujos ocorrem pelo menos dois estágios de esporocisto (4) que produzem as cercárias (5). Quando liberadas, estas formas evolutivas com capacidade de nado penetram a pele do hospedeiro definitivo (6), perdem a cauda dando origem ao esquistossômulo (7). O esquistossômulo migra pelos tecidos, e até a fase adulta (8; 9). Os vermes adultos, em casais, fixam-se nas veias onde irão residir de acordo com a espécie (10). A – Vermes adultos de *Schistosoma japonicum* têm preferência pelas veias mesentéricas superiores do intestino delgado. B – Os casais de *Schistosoma mansoni* encontram-se usualmente nas veias mesentéricas do intestino grosso. C – Os vermes de *Schistosoma haematobium* são encontrados no plexo vesical. Fonte: Modificado de Schistosomiasis Biology, Centers for Disease Control - CDC.

O ciclo de vida do *S. mansoni* é caracterizado por duas fases bem delineadas, uma que ocorre no hospedeiro intermediário, e outra que ocorre no hospedeiro definitivo, homem ou outros vertebrados (MODENA, SANTOS-LIMA e COELHO, 2008). As formas evolutivas consistem em ovo, miracídio, esporocistos, cercária, esquistossômulo e verme adulto, sendo o miracídio e a cercária as duas formas larvárias com capacidade natatória. Nos moluscos hospedeiros, o ciclo é assexuado e tem duração de cerca de 40 dias da penetração do miracídio a eliminação das cercárias, enquanto que no hospedeiro definitivo, a fase é sexuada, vai da penetração das cercárias até a eliminação dos ovos nas fezes, o que também dura aproximadamente 40 dias (KATZ e ALMEIDA, 2003).

### 1.2.1. OVO

Os ovos maduros, ao atingirem o ambiente aquático, sofrem influência de baixa osmolaridade do meio, e segundo Standen (1951) estímulos luminosos, bem como a temperatura entre 10-37°C são as condições básicas necessárias para o rompimento do ovo. O tempo máximo de vida do miracídio é de apenas 8 horas, e o transcriptoma do *S. mansoni* evidenciou a presença de componentes sensíveis à luz, que colabora com seu fototropismo (VERJOVSKI-ALMEIDA *et al.*, 2003). O caramujo também apresenta comportamento semelhante, o estímulo fótico leva a exposição da massa cefalopodal (COELHO *et al.*, 2008), o que favorece substancialmente a infecção do molusco.

### 1.2.2. MIRACÍDIO

Após a adesão, o miracídio penetra no caramujo fazendo uso de movimentos contráteis e rotatórios, enquanto que o conteúdo das glândulas de penetração é liberado, iniciando a digestão de tecidos. Ao ultrapassar o epitélio, a larva se estabelece no molusco (COELHO *et al.*, 2008) e, durante as primeiras 48 horas, esta permanece próxima à região que penetrou, perdendo suas glândulas e musculatura (STURROCK, 2001). Toda interação parasito-hospedeiro ocorre pelo contato do tegumento e seus produtos com a hemolinfa que possui inúmeras proteínas plasmáticas (YOSHINO, BOYLE e HUMPHRIES, 2001), bem como células com função imunitária, denominados hemócitos, o que desencadeia respostas imunopatológicas no hospedeiro (BAYNE, 2009). Em contrapartida o parasito apresenta mecanismos para mimetizar o hospedeiro (LEHR *et al.*, 2008), e inibir produtos tóxicos do mesmo (BENDER *et al.*, 2007).

### 1.2.3. ESPOROCISTO

Então, em 72 horas ocorre multiplicação das células germinativas no miracídio, o saco celular dobra de tamanho e recebe o nome de esporocisto primário, a partir dessa massa celular formam-se os esporocistos secundários, que irão migrar para regiões mais nutritivas: glândulas digestivas ou hepatopâncreas (COELHO *et al.*, 2008). Em seguida, ocorrem modificações anatômicas no esporocisto secundário que apresenta três regiões na sua morfologia: a posterior, média e anterior. A região posterior possui células germinativas; a porção média apresenta cercárias em diferenciação ou maduras, e a mais anterior é identificada por uma invaginação do tegumento, onde se localiza o poro de nascimento das cercárias. A região mais anterior é rica em mitocôndrias, ribossomos e retículo endoplásmico, além de apresentar camada citoplasmática mais fina (FOURNIER e THERÓN, 1985).

### 1.2.4. CERCÁRIA

As cercárias se originam das células germinativas dispostas em uma mórula, da formação completa até sua emergência, leva cerca de 30 dias (COELHO *et al.*, 2008). Assim como o verme adulto, as cercárias possuem tegumento formado por um sincício de dupla membrana heptalamina, coberta por glicocálix, que também recobre os espinhos e papilas sensoriais (DORSEY *et al.*, 2002).

A cauda da cercária é um órgão locomotor que consiste em duas partes: talo e cauda bifurcada. O corpo cercariano é a parte anterior da cercária que mede aproximadamente 200 µm. A porção anterior do corpo, através principalmente da ventosa oral, é responsável pela fixação e invasão no hospedeiro. Já na porção inferior encontram-se a ventosa acetabular, as glândulas que terminam na ventosa oral, futuras células do sistema digestório, além das células nervosas, musculares, bem como as germinativas que originarão os órgãos sexuais (DORSEY *et al.*, 2002).

O encontro entre a cercária e o hospedeiro definitivo se deve pela fototaxia (WEBSTER *et al.*, 2001), termotaxia (McKEROOW e SALTER, 2002) e aumento da atividade frente à ceramidas liberadas pela pele do hospedeiro (HAEBERLEIN e HASS *et al.*, 2008). Todos estes fatos possibilitam maior nado, aumentando as possibilidades de contato (COELHO *et al.*, 2008). A invasão pelo corpo cercariano se deve a liberação de secreções das glândulas pós e pré-acetabulares, auxiliado pelo movimento vibratório da cauda e abrasivo dos espinhos tegumentares (COELHO *et al.*, 2008).

### 1.2.5. ESQUISTOSSÔMULO

A passagem de um ambiente de vida livre para o hospedeiro definitivo é marcada por intensas modificações morfológicas e bioquímicas no parasito. Uma vez que esse novo habitat apresenta diferenças de temperatura, diferentes gradientes de concentração e níveis de osmolaridade, bem como uma intensa atividade imunológica a qual o parasito é submetido (COELHO *et al.*, 2008).

O esquistossômulo em formação perde o glicocálix, desenvolve um tegumento heptalaminar e aglomera proteínas transportadoras de glicose, logo nos primeiros dias, o que especializa esta estrutura para atividades de absorção e secreção (SKELLY e SHOEMAKER, 2000). O verme juvenil recém-formado atravessa a pele do hospedeiro até atingir a corrente sanguínea, guiando-se pelo aumento da concentração de arginina e glicose (GRABE e HASS 2004). Dentro de alguns dias, este alcança a pequena circulação, e posteriormente, chega ao pulmão, onde já é possível observar pigmento da digestão de hemácias (hemozoína) no ceco ainda em desenvolvimento, sendo que após este estágio, os esquistossômulos migram para o fígado (REY, 2001). Cerca de três semanas após a infecção os esquistossômulos de *S. mansoni* encontram-se no fígado onde irão desenvolver seus órgãos por completo, dentre estes, o aparelho reprodutivo de ambos, macho e fêmea, iniciando quatro semanas depois, a gametogênese.

### 1.2.6. VERMES ADULTOS

O macho apresenta corpo esbranquiçado, comprimento médio de 10 mm, utiliza a ventosa oral para deslocamento, alimentação e eliminação de resíduos metabólicos, enquanto que o acetábulo funciona apenas como estrutura de fixação (MACHADO-SILVA, NEVES e GOMES 2008). Possui um sistema excretor que mantêm a pressão hidrostática por meio de células flama, associadas a túbulos coletores que se abrem pelo poro excretor na porção distal do verme, semelhante a outras formas evolutivas do *S. mansoni* (BAHIA *et al.*, 2006).

O canal ginecóforo e número total de lobos testiculares se completam na quinta semana após infecção. O tegumento é formado por sincício de corpos celulares, contendo os núcleos em regiões subtegumentares, e apresenta papilas sensoriais dispersas pelo canal ginecóforo, enquanto que na porção dorsal é formado por inúmeros tubérculos com espinhos (MACHADO-SILVA, NEVES e GOMES 2008).

A fêmea do *S. mansoni* ao entrar em contato com o macho passa por alterações estruturais e bioquímicas, como a produção de células vitelínicas e aumento do nível de captação de metabólitos do hospedeiro (MACHADO-SILVA, NEVES e GOMES 2008). Apresenta em média 14 mm de comprimento, corpo filiforme, sendo mais escura do que o macho, uma vez que digere cerca de dez vezes mais hemácias (REY, 2001).

Ela possui um único ovário com formato elíptico, onde ovócitos em diferentes estágios de maturação seguem pelo oviduto, sendo fecundados pelos espermatozóides armazenados na espermateca. O viteloduto, que se une ao oviduto, por meio de glândulas e células especializadas, garante a completa formação do ovo e sua casca. Desta maneira, apenas um ovo por vez completo é albergado no canal uterino, em seguida alcançando finalmente o exterior através do poro genital (MACHADO-SILVA, NEVES e GOMES 2008). O tegumento também é formado por um sincício, porém é menos espesso e só apresenta espinhos na sua porção póstero-distal (SKELLY e WILSON, 2006).

Uma vez acasalados, os vermes adultos em humanos migram para interior dos vasos sanguíneos da parede do reto, do sigmóide e do intestino grosso (MACHADO-SILVA, NEVES e GOMES 2008). Em seu habitat definitivo, a fêmea fecundada coloca entre 150 e 300 ovos por dia, cerca de 50% dos ovos liberados passam para luz intestinal como resultado da indução da resposta imune do hospedeiro por um conjunto de antígenos presentes nos ovos ('soluble egg antigen', SEA) (LENZI *et al.*, 2008). Na luz intestinal os ovos são eliminados junto às fezes, iniciando o ciclo evolutivo do *S. mansoni* (REY, 2001).

### 1.3. PATOLOGIA

A esquistossomose mansônica se apresenta em duas fases ou formas, aguda e crônica (REY, 2001), sendo a fase inicial conhecida como esquistossomose aguda, enquanto que a segunda fase denomina-se esquistossomose crônica, que apresenta subclassificações de acordo com características apresentadas pelo quadro clínico e histopatológico. Segundo Andrade (2008), a forma denominada esquistossomose crônica intestinal é classificada como forma crônica leve, pois não existe infecção esquistossomótica sem lesão hepática, mesmo que essa seja imperceptível do ponto de vista clínico. Dentre as formas crônicas essa é a mais comum, acometendo 90% dos casos crônicos. Ainda de acordo com essa classificação, a forma anteriormente denominada como hepatointestinal é nomeada de hepática avançada, e a forma hepatoesplênica. Estas duas últimas formas são consideradas graves, e acontecem em pelo

menos 4% dos casos. Deve-se pontuar que complicações como pneumopatia, glomerulopatia e linfoma esplênico não-Hodgkin são extremamente raras na atualidade.

### 1.3.1. FASE AGUDA

A esquistossomose aguda caracteriza-se, basicamente, pela reação de hipersensibilidade à invasão da cercária, migração dos esquistossômulos e postura dos ovos. O fígado é o principal órgão afetado, no entanto a pele, os pulmões, linfonodos abdominais, o pâncreas, assim como o cérebro podem ser sofrer danos (LAMBERTUCCI, 2010).

Durante a penetração da cercária alguns indivíduos manifestam dermatite pruriginosa levando a erupções cutâneas após algumas horas, que pode persistir por até duas semanas (REY, 2001). A dermatite é um fenômeno sazonal, uma vez que apresenta maior prevalência nos meses quentes, pois a eliminação de cercárias pelos moluscos hospedeiros aumenta. Bem como o lazer em torno de recursos hídricos infestados (LAMBERTUCCI, 2010).

A supressão dos sinais cutâneos corresponde ao período de incubação, que pode durar de quatro a oito semanas, enquanto os esquistossômulos estão se desenvolvendo. Após esse tempo, os pacientes podem apresentar febre alta, mal estar, astenia, urticária, tosse, anorexia, náuseas, vômitos, mialgias, cefaléia e diarreia. Em virtude desses sintomas não serem patognomônicos, pois estão presentes em outras doenças infecciosas e parasitárias, o quadro clínico pode não definir o diagnóstico (REY, 2001).

A fase aguda é marcada por uma resposta imune com a predominância da modulação do tipo Th1, onde entre a terceira e quinta semana em repostas à citocinas pro-inflamatórias como IL-2 (interleucina-2) ocorre a proliferação e seleção de linfócitos CD4<sup>+</sup> Th1, que liberam INF- $\gamma$  (interferon-gama), ativando macrófagos que liberam TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral-alfa) que proporciona o aumento de pirógenos (IL-1 e IL-6 – interleucina-1 e interleucina-6), que podem ser medidas no plasma (PEARCE e MACDONALD, 2002; McADAM e SHARPE, 2005; LAMBERTUCCI, 2010). Nessa fase, os granulomas são grandes com componente predominante exudativo com muitos eosinófilos, periferia pouco delimitada e frequente necrose central ou no entorno do ovo (ANDRADE, 2008). Essa fase pode durar de 1 a 2 meses, desaparecendo quando o paciente é submetido ao tratamento específico ou podendo evoluir para a fase crônica, quando não é realizada a terapêutica adequada (KATZ; ALMEIDA, 2003).

### 1.3.2. FASE CRÔNICA

A esquistossomose, por suas características e duração, se configura como uma doença crônica, e nesse estágio pode evoluir de formas variadas, mas em todas são encontrados granulomas com presença maciça de macrófagos e extensa área rica em colágeno (ANDRADE, 2008). O perímetro formado pelo granuloma durante a esquistossomose crônica possibilita o sequestro ou limitação das toxinas presentes nos ovos (WILSON *et al.*, 2007).

A contenção promovida pelo granuloma é possível pela alteração da resposta imune Th1 para uma resposta do tipo Th2, que acontece de 5 a 6 semanas após o início da deposição de ovos, com consequente produção de IL-10 (interleucina-10) que suprime a atividade de macrófagos (PEARCE e MACDONALD, 2002; McADAM e SHARPE, 2005). Reiman e colaboradores em 2006 demonstraram em camundongos que a fibrose e parte da patologia da fase crônica são mediadas por citocinas da resposta Th2, o que apóia trabalhos onde nota-se a forte associação de IL-5 e IL-13 (interleucina-5 e interleucina-13) à fibrose hepática de indivíduos de áreas endêmicas (JESUS *et al.*, 2004). Diversos estudos também evidenciam que a incapacidade em desenvolver uma resposta imune do tipo Th2 torna a infecção fatal, em razão dos efeitos hepatotóxicos em resposta aos elementos liberados dos ovos (LAMBERTUCCI, 2010). Desta maneira, o balanço entre as respostas Th1 e Th2, é essencial para a sobrevivência do hospedeiro. Apesar da resposta Th2 se apresentar como mediadora da patologia na forma crônica, ela garante contenção de antígenos liberados pelos ovos.

A forma crônica mais comum é leve e apresenta-se na maioria das pessoas infectadas nas áreas endêmicas, os hospedeiros são assintomáticos ou apresentam queixas vagas e inespecíficas (ANDRADE, 2008). Alguns casos, no entanto, progredem para fibrose hepática periportal, o que possibilita o desenvolvimento de hipertensão portal; esplenomegalia; varizes esofágicas; hematêmese, tais quadros clínicos caracterizam as formas mais graves da esquistossomose crônica (CALDAS *et al.*, 2008).

Indivíduos que apresentam a forma crônica leve possuem granulomas que se apresentam isolados em alguns órgãos, principalmente no fígado. Estes se encontram em diversos estágios de cicatrização, e a baixa densidade de granulomas na análise histopatológica ressalta absorção das lesões mais antigas (ANDRADE e PRATA 1968 apud ANDRADE, 2008). E segundo Cheever (1968), a carga parasitária de portadores da forma leve é geralmente baixa e tende a continuar demonstrando indícios de imunidade.

A forma grave da esquistossomose crônica geralmente se desenvolve na infância, e pode ser classificada como forma hepática avançada, onde apesar da fibrose periportal



esquistossomótica não existe esplenomegalia (ANDRADE, 2008). Essa condição da forma crônica ficou evidenciada com utilização da ultrassonografia no diagnóstico das formas graves (COUTINHO, 1990).

Na forma hepatoesplênica, a fibrose portal resultante do grande número de ovos de *Schistosoma mansoni* e suas reinfecções (SANTOS, SOUZA e ANDRADE, 2000), acarreta a destruição progressiva de ramos periféricos, o que provoca a expansão dos ramos laterais e consequentemente possibilita a deposição de mais ovos no espaço porta (ANDRADE, 2008). A redução do fluxo sanguíneo do território drenado pela veia porta, a hipertensão portal, leva à congestão do baço, adicionalmente a presença de grande quantidade de substâncias antigênicas conduz a uma hiperplasia dos elementos celulares esplênicos, tais aspectos causam a esplenomegalia (MAGALHÃES FILHO; COUTINHO, 1960).

#### 1.4. TRATAMENTO

Desde o início do século XX inúmeras substâncias foram propostas para o tratamento da esquistossomose, no entanto, só na década de 40 durante a Segunda Guerra Mundial é que foi descoberta a Lucantona, um derivado da tioxantona, a primeira droga de uso oral com efeito esquistossomicida efetivo, mas logo foi abandonada em virtude dos efeitos colaterais (COURA e CONCEIÇÃO, 2010). Durante os anos 60 através de uma hidroximetilação na Lucantona, se desenvolveu Hicantona, uma droga com potente efeito sobre os vermes. Esta caiu em desuso na década seguinte, uma vez que ficou evidenciada que causava necrose aguda do fígado, levando ao óbito os pacientes por falência hepática (ANDRADE *et al.*, 1974).

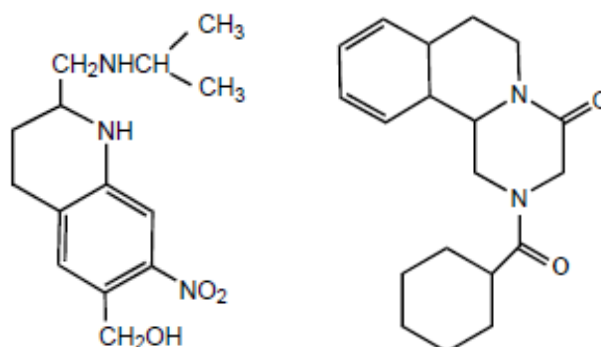


Figura 4: Oxamniquina e praziquantel (HUANG, RIGOUIN e WILLIAMS, 2012).

Na década seguinte foram criadas as principais drogas de escolha para o tratamento da esquistossomose mansônica: Oxamniquina e Praziquantel (Figura 4). Essas drogas

demonstraram um alto poder de cura para esquistossomose, porém apresentam alguns efeitos colaterais. Haja vista sua eficácia, a OMS coloca o Praziquantel como padrão ouro para o tratamento de esquistossomose. Ambas são de extrema importância para controle da prevalência e morbidade dessa doença (KATZ, 2008).

#### 1.4.1. OXAMNIQUINA

Oxamniquina foi um produto resultante da oxidação de Hicantona pelo fungo *Aspergillus sclerotiorum*, a qual só apresenta efeito sobre a espécie *S. mansoni*. Durante os primeiros ensaios clínicos da década de 70 e 80, apresentou eficácia elevada com base na avaliação da carga parasitária pelo método Kato-Katz (COURA e CONCEIÇÃO, 2010).

Quando essa substância é ativada por uma sulfotransferase presente apenas no parasito, ela inibe a síntese de ácido nucléico por alquilação irreversível (RIBEIRO-DOS-SANTOS; VERJOSVSKI-ALMEIDA e LEITE, 2007), ocasionando inibição da oviposição e lesões tegumentares nos vermes adultos (COURA e CONCEIÇÃO, 2010).

Efeitos adversos são frequentemente relacionados ao tratamento por oxamniquina, os principais são: tonturas, náuseas, cefaléia e sonolência, sendo com registros menos frequentes, vômito e dores abdominais (KATZ, 2008). Apesar dos efeitos colaterais, esta droga foi bastante usada no Brasil, mas estudos demonstram redução da eficácia esperada quando analisado biópsias retais de indivíduos de área endêmica em Minas Gerais (FERRARI *et al.*, 2003).

#### 1.4.2. PRAZIQUANTEL

A primeira droga de escolha para o tratamento da esquistossomose, causada pelas espécies do gênero *Schistosoma*, foi desenvolvida como derivado de uma pirazinoisoquinolina. Atualmente é largamente usada no mundo, sendo produzida pela indústria farmacêutica coreana, chinesa e também pela FIOCRUZ no Brasil (KATZ, 2008). Apresenta um grau de eficácia de 80% a 90%, é rapidamente absorvida, metabolizada no fígado e atinge altos níveis de biodisponibilidade, atuando em todas as espécies causadoras da esquistossomose (COURA e CONCEIÇÃO, 2010).

Praziquantel leva à paralisia espástica do verme adulto, conseqüentemente ocorre lesão tegumentar, interferindo na habilidade do parasito em escapar do sistema imune. Evidências apontam que este efeito se deve à redução da atividade dos canais de  $Ca^{2+}$  do verme, aumentando os níveis deste íon no citoplasma, inclusive nas fibras musculares, o que causa uma

intensa contração muscular no *S. mansoni* (KOHN *et al.*, 2003). Porém, outro trabalho questiona o influxo de cálcio, uma vez que ao ser utilizada citocalasina D, que é um inibidor da polimerização de actina e importante para contração muscular, o efeito do praziquantel é revertido (DOENHOFF; CIOLI e UTZINGER, 2008).

Os principais efeitos adversos causados pelo praziquantel são: anorexia; dor abdominal; diarreia; náuseas; vômitos; cefaléia; prostração e sonolência (COURA e CONCEIÇÃO, 2010).

No entanto, foram relatados casos de resistência no Senegal, onde 18-38% dos indivíduos tratados possuem parasitos resistentes ao praziquantel (DASO-APPIAH e DE VLAS, 2002). Trabalhos *in vitro* e *in vivo* evidenciam a resistência das formas juvenis dos vermes (PICA-MATTOCIA e CIOLI, 2004). Provavelmente estes casos resultam de regimes terapêuticos sub-curativos, que permitem a persistência de baixas cargas parasitárias, selecionando espécimes, os quais podem ocasionar infecções refratárias à terapêutica. Desta maneira, tanto o surgimento de novas cepas de *S. mansoni* resistentes às drogas atualmente disponíveis, quanto os efeitos colaterais destas, demonstram a importância do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

## 1.5. ESTRESSE OXIDATIVO

Segundo Sies (1997): “Um desequilíbrio entre agentes oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, potencialmente nocivo, denomina-se estresse oxidativo.”. Entende-se por espécies oxidantes, elementos que ao receber elétrons de outras moléculas permanecem com um elétron desemparelhado, o que os tornam extremamente reativos e são conhecidos pela alcunha de “radicais livres”. Quando de procedência biológica, resultam do metabolismo celular (principalmente organismos aeróbicos) ou da atividade microbicida por células com função imunológica em diversos organismos, bem como da sinalização celular (CHIUMIENTO e BRUSCHI, 2009). Em contrapartida, antioxidantes são compostos que podem ser catalíticos ou não, os quais em baixas concentrações em relação ao seu substrato oxidável retardam ou inibem significativamente a oxidação deste substrato (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Tratando-se de um endoparasito que habita as veias mesentéricas do seu hospedeiro definitivo, os vermes adultos do *S. mansoni* apresentam uma taxa de transcrição menor para enzimas do metabolismo aeróbio, quando comparada a outras formas evolutivas (SKELLY e SHOEMAKER, 1995), o que é razoavelmente explicável em virtude das baixas concentrações de oxigênio molecular e altos níveis de glicose nesse microambiente, favorecendo a fermentação. O contato majoritário com as espécies oxidativas, se deve a interação parasito-

hospedeiro, seja em razão da ingestão dos metabólitos do hospedeiro (CHIUMIENTO e BRUSCHI, 2009), ou pela atividade de células fagocíticas do infectado (WILSON e COULSON, 2009).

As espécies oxidantes com que o verme adulto se relaciona são produzidas por neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e basófilos, células do sistema imunitário que produzem espécies oxidantes baseadas, principalmente, em oxigênio, denominadas de espécies reativas de oxigênio (ERO), com a finalidade de eliminar agentes nocivos desde vírus até helmintos (LAMBETH, 2004). Desta maneira é de extrema importância para o parasito, possuir mecanismos de escape, que vão da barreira mecânica ao uso de enzimas especializadas na inibição da formação de ERO, bem como na sua detoxificação ou reversão dos danos causados por eles.

Os indivíduos do gênero *Schistosoma* apresentam algumas famílias de enzimas antioxidantes capazes de neutralizar diretamente as espécies oxidantes ou reduzir biomoléculas que os neutralizam, entre elas estão: glutathione S-transferase (GST); peroxirredoxina (PRX); superóxido dismutase (SOD) e tioredoxina-glutathione redutase (TGR). Esses constituem os principais sistemas enzimáticos presentes no gênero em estudo.

Alger e colaboradores demonstraram em 2002 que a presença de tióis ativa as PRX do parasito, protegendo-o do ataque de ERO do hospedeiro possibilitando a passagem para a luz intestinal de ovos viáveis. Os vermes *S. mansoni* apresentam a PRX 2-Cis (KWATIA *et al.*, 2000). Esta família de enzimas possui peptídeos com 2 cisteínas terminais, utilizam como fontes de tióis a tioredoxina e a glutathione para oxidação de peróxido de hidrogênio, provenientes da atividade da TGR (SAYED e WILLIAMS, 2004).

A estrutura e atividade da TGR vêm sendo recentemente elucidadas. Diferentes de outros animais, alguns platelmintos incluindo o gênero *Schistosoma*, não apresentam a Tiorredoxina redutase (TRX) e a Glutathione redutase (GSR), no entanto possui uma única enzima multifuncional, a TGR (KUNTZ *et al.*, 2007). A sequência peptídica, bem como a estrutura da TGR apresenta similaridades com a TRX e a GSR de mamíferos (ALGER e WILLIAMS, 2002). Na porção amino-terminal existe uma glutarredoxina que permite a enzima oxidar glutathione, enquanto que na extremidade carboxi-terminal, está presente uma selenocisteína, comum as TRX, que capacita o complexo enzimático a reduzir tioredoxinas (JOHANSSON, GAFVELIN e AMER, 2005).

A família Glutathione S-transferase (GST) apresenta 5 isoformas no *S. mansoni* e a dosagem da transcrição dessa enzima demonstra quantidades de 10 a 100 vezes maiores que outras integrantes do sistema antioxidante (MEI e LoVERDE, 1997). As três primeiras formas

foram localizadas em diferentes células parenquimatosas nos tubérculos do macho adulto e nas células sexuais de ambos os gêneros (HOLY *et al.*, 1989; LIU *et al.*, 1996). A GST possibilita a conjugação de compostos eletrofílicos à glutationa, funcionando como importante detoxificador de xenobióticos (SHEENAM *et al.*, 2001)

Trabalhos avaliando a toxicidade do artemeter no *S.mansoni* demonstraram que ocorre uma diminuição de GST nas formas evolutivas que parasitam o hospedeiro intermediário, apresentando característica dose e tempo dependentes (EL-BASSIOUNI *et al.*, 2007). Uma GST da classe  $\omega$  de 28 kDa (SmGSTO) vem sendo considerada como candidata à vacina, pois é expressa em todas formas evolutivas, inclusive em vermes adultos (CAPRON *et al.*, 2005). Alguns estudos apresentam imunização moderada de animais, mas com capacidade significativa reduzir os danos causados pela deposição de ovos (BOULANGER *et al.*, 1991) e em outras espécimes de *Schistosoma* (GRZYCH *et al.*, 1998).

A SOD é uma metaloenzima intrínseca a fosforilação oxidativa, pois esse metabolismo apresenta o oxigênio ( $O_2$ ) como acceptor final de elétrons, o qual se torna, eventualmente, superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ) que é altamente reativo (FRIDOVICH, 1995). Desta maneira, a família de enzimas da superóxido dismutase é capaz de realizar a dismutação do superóxido em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (McCORD e EDEAS, 2005). No caso do parasito *S. mansoni*, entretanto, o maior aporte de  $O_2^{\cdot-}$  provém da atividade da resposta imune do hospedeiro.

No *S. mansoni*, são encontradas duas formas da SOD, dependentes de cobre e zinco (Cu/Zn-SOD), além da mitocondrial que apresenta manganês (Mn-SOD). Existem três isoformas da Cu/Zn-SOD, uma citosólica (CT-SOD), uma extracelular (SOD) e uma associada à membrana que contem peptídeo-sinal (PS-SOD) (MKONJI *et al.*, 1988; NARE *et al.*, 1990). Todas as formas são mais expressas em vermes adultos, principalmente no tegumento e no epitélio intestinal. A forma associada à membrana, todavia se apresenta nas células parenquimatosas e na membrana das organelas celulares (HONG *et al.*, 1992; MEI e LoVERDE 1997). LoVerde e colaboradores demonstraram que CT-SOD possui capacidade de imunizar camundongos, com poder de proteção próximo de 40%, tornando-se uma candidata a vacina.

## 1.6. CRISTALIZAÇÃO DO HEME

Organismos que digerem sangue desfrutam de uma excelente fonte nutricional, onde a hemoglobina corresponde à principal fonte protéica, no entanto a digestão da hemoglobina libera enormes quantidades de heme, grupo prostético da hemoglobina. O heme é molécula chave para células vivas, pois desempenha importante papel fisiológico, catalisando inúmeros

processos biológicos oxidativos (PONKA, 1999). Além disso, possibilita a transferência de elétrons, transporte de gases, geração de energia, bem como se destaca em outros sistemas enzimáticos (KUMAR e BANDYOPADHYAY, 2005) e pode se apresentar como molécula pró-inflamatória em processos hemolíticos (ARRUDA, 2005).

O heme é uma molécula anfifílica, que podem se associar às membranas biológicas e gerar radicais livres pela presença do átomo central de ferro (STIEBLER, 2011). Todavia, seus efeitos aumentam drasticamente quando em estado livre, produzindo radicais livres e conseqüentemente provocando danos aos nucleotídeos, proteínas e lipídios (RYTER e TYRRELL, 2000). A morte celular pode ser em decorrência destes efeitos pró-oxidantes, que levam à inibição de múltiplas enzimas (AFT e MUELLER, 1984) e causam danos às membranas através da lipoperoxidação, resultando em ruptura física alterando a permeabilidade da membrana (SCHMITT, FREZZATTI e SCHEREIER, 1993).

Dessa maneira, fica evidenciada a necessidade de um mecanismo capaz de diminuir os efeitos nocivos do heme em organismos hematófagos. Após inúmeros avanços no estudo do pigmento malárico, hoje chamado de hemozoína (Hz), foi demonstrado que essa possui estrutura cristalina e composta por heme (FITCH e KANJANANGGULPAN, 1987). A Hz é formada a partir da ligação recíproca entre o ferro de um heme com o carboxilato de outro, formando dímeros, que por sua vez interagem com outros por ligações de hidrogênio com os grupos propionatos pertencentes à cadeia lateral (PAGOLA *et al.*, 2000).

Hoje se sabe que a Hz é a principal forma utilizada para evitar os efeitos tóxicos do heme nos agentes etiológicos da malária, pois graças a formação deste cristal 95% do heme digerido pelo *Plasmodium sp.* é incorporado na Hz (EGAN *et al.*, 2002). A produção de hemozoína também foi identificada em outro protozoário, *Haemoproteus columbae* (CHEN *et al.*, 2001); em triatomíneos, *Rhodnius prolixus* (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Da mesma maneira o heme é detoxificado no *S. mansoni* (OLIVEIRA, 2000), que proporciona a tonalidade escura dos vermes, principalmente nas fêmeas.

Há muito tempo relata-se a presença de lipídeos extracelulares no intestino de vermes adultos de *S. mansoni* semelhantes a gotas (MORRIS, 1968). No entanto, Corrêa Soares e colaboradores (2007) demonstraram que cristais de Hz estão associados à superfície de gotas lipídicas, onde se desenvolvem, o que apóia trabalhos que demonstram que a cristalização do heme ocorre de maneira mais eficiente em interfaces orgânico-aquosa e lipídico-aquosa (EGAN *et al.*, 2006; HOANG *et al.*, 2010).

## 1.7. PERSPECTIVAS

O notável aumento do conhecimento a respeito da biologia do gênero *Schistosoma*, especialmente das espécies *S. mansoni* e *S. japonicum*, pelo emprego de técnicas moleculares de larga escala, métodos bioquímicos e técnicas avançadas de microscopia, fazem identificar novos alvos para quimioterapia e candidatos imunoterápicos (HOKKE; FITZPATRICK e HOFFMANN, 2007; DORSEY *et al.*, 2002; GOBERT *et al.*, 2003; COLLINS *et al.*, 2011). Atualmente existem bancos de dados destinados à catalogação e identificação de genes de alguns parasitos. Desta maneira, após o sequenciamento dos transcritos, realizado pelo grupo liderado por Verjosvski-Almeida em 2003, criou-se o Schisto-DB, banco de dados genéticos presentes por *Schistosoma sp.*. Onde, baseado na comparação da similaridade de genes do *S. mansoni* a outras espécies, é possível inferir aproximadamente 607 reações enzimáticas, as quais podem se tornar novos alvos para o tratamento (ZERLOTINI e OLIVEIRA, 2011).

Com base nas informações a respeito do parasito, torna-se acessível o desenvolvimento de novos fármacos com aplicação na esquistossomose, principalmente na inibição da seleção de possíveis linhagens resistentes aos fármacos de primeira escolha. Shaohong e colaboradores em 2006 demonstraram que as formas jovens de *S. mansoni* são susceptíveis ao emprego do artesunato, composto utilizado no tratamento da infecção pelo *S. japonicum*. Inúmeros trabalhos apresentam o emprego de novas substâncias no combate à esquistossomose, Sayed e colaboradores (2008) apresentaram resultados *in vitro* e *in vivo* de oxadiozois, bem como o grupo de BOTROS (2009) apresentaram resultados com hexadeciloxipropil cíclico. Outros trabalhos apresentam o emprego de substâncias conhecidas utilizadas para outras doenças e parasitos, mas ainda não avaliadas quanto ao efeito sobre trematódeos como a ciclosporina A, cloroquina e curcumina (CAFFREY, GSELL e RUPPEL, 1999; OLIVEIRA *et al.*, 2004; MAGALHÃES *et al.*, 2009).

Dentre as atuais possibilidades de tratamento de diversas doenças, a combinação de drogas é uma vertente extremamente aconselhável. A reunião de ervas medicinais para o tratamento ou redução de sofrimento é prática comum na Medicina Tradicional Chinesa (CHOU, 2007). Deste modo, a capacidade de isolamento e síntese da atualidade permite um maior número de combinações de drogas (CHOU, 2007). Essa metodologia quimioterápica ainda é pouco explorada na esquistossomose, mas na última década, foram publicados trabalhos avaliando a atividade de drogas combinadas ao *S. mansoni* (XIAO *et al.*, 2003; ARAUJO *et al.*, 2008; KEISER, MANNECK e VARGAS, 2011).

Diante desta perspectiva, o emprego de drogas quinolínicas que inibem a cristalização do heme (EGAN e NCOKAZI, 2005), para o tratamento de camundongos infectados por *S. mansoni* apresentou resultados satisfatórios (OLIVEIRA *et al.*, 2004; CORRÊA-SOARES *et al.*, 2009). Aliadas às substâncias que interferem no sistema antioxidante do parasito, há uma chance de intensificar os efeitos deletérios do heme livre. Tal inferência é corroborada pelo efeito esquistossomicida do artemeter que atua sobre mecanismos antioxidantes, incluindo o sistema SOD (XIAO *et al.*, 2002).

Desta forma, neste projeto avaliamos a efetividade *in vitro* da cloroquina (CLQ) frente aos vermes adultos do *S. mansoni*, antimalárico reconhecido pela capacidade de inibir a cristalização do heme, bem como do dietilditiocarbamato de sódio (DDC), conhecido inibidor da SOD, tanto isoladas como combinadas, como o intuito de verificar atividade esquistossomicida sinérgica entre elas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo avaliar a combinação da cloroquina ao dietilditiocarbamato de sódio sobre as formas evolutivas do *Schistosoma mansoni*, selecionando potenciais regimes terapêuticos para o tratamento da esquistossomose.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Avaliar a citotoxicidade das drogas em estudo através da função mitocondrial em esplenócitos;
- Determinar os efeitos da cloroquina e do dietilditiocarbamato de sódio, combinados e isolados na sobrevivência *in vitro* de vermes adultos;
- Investigar a possibilidade de interação aditiva e/ou sinérgica entre os fármacos citados;
- Avaliar as alterações ultraestruturais produzidas pelas drogas selecionadas;
- Analisar os mecanismos de atuação dos fármacos isolados e/ou em combinação.



### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 FÁRMACOS

Praziquantel e cloroquina foram cedidos pela Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (FIOCRUZ – Manguinhos). dietilditiocarbamato de sódio (DDC) foi adquirido da Sigma-Aldrich. Todos são mantidos em local refrigerado e protegidos da luz.

#### 3.2 ANIMAIS

Camundongos da linhagem Swiss Webster (*Mus musculus*, fêmeas de 6-8 semanas) foram criados e mantidos no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Salvador, BA).

##### 3.2.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Toda manipulação de animais experimentais foi realizada seguindo os princípios preconizados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz-RJ, que estão de acordo com a Lei Sergio Arouca 11.794 de 2008. O projeto foi aprovado pelo comitê anteriormente citado com o número de licença 023/09.

#### 3.3 CITOTOXICIDADE EM ESPLÊNOCITOS

Para determinar a citotoxicidade das drogas ao hospedeiro foi utilizado o método de Mosmann (1983), com algumas modificações. Esplenócitos de camundongos foram obtidos pela homogeneização de baços. Separados por centrifugação, 1500 rpm, a concentração de  $10^7$  células foi incubada por vinte quatro e quarenta oito horas com diferentes quantidades das drogas em 150  $\mu$ L de RPMI-1640 com 10% de soro fetal bovino, 0,08% de gentamicina, 10 U/mL de penicilina e 0,01% de estreptomicina. Após o período de incubação com a cloroquina e dietilditiocarbamato de sódio foi adicionada a solução de 15  $\mu$ L de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium) a 10% em solução tampão de fosfato com salina (PBS), as amostras foram mantidas ao abrigo. Em seguida, foram centrifugadas por 10 min a 3.000 rpm e por fim, adicionado 165  $\mu$ L dimetilsulfóxido (DMSO). A produção de formazan pela redução do MTT foi determinada pela absorbância do sobrenadante a 570 nm, em espectrofotômetro de microplaca VERSAmax (Molecular Devices).

### 3.4 INFECÇÃO POR *S. mansoni*

Cercárias de *S. mansoni* foram obtidas de moluscos da espécie *B. glabrata*, infectados com a cepa Feira de Santana. Os caramujos são mantidos pelo moluscário do CPqGM/FIOCRUZ o qual fornece as cercárias. As infecções foram realizadas em fêmeas com idades entre 30 a 45 dias, por injeção intraperitoneal 200 a 250 cercárias em até 1 mL de solução salina.

### 3.5 CURVA DE SOBREVIVÊNCIA *IN VITRO*

Após aproximadamente 45 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados, com retirada de sangue por punção cardíaca, para posterior alimentação dos vermes *in vitro*, extraíndo os vermes por perfusão, e imersos em RPMI 1640 10,4 g/L (Gibco) com: 2% de glutamina, 5,26% de soro fetal bovino, 0,2% de bicarbonato de sódio, 0,48% de HEPES, ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina-etanosulfônico, e o dobro da concentração de antibióticos usada no cultivo (10 U/mL penicilina/0,01% estreptomicina e 0,05% gentamicina).

Terminada a retirada, os vermes foram lavados com o mesmo meio, realizando trocas gradativas de meio com a concentração de antibióticos para o cultivo (5 U/mL penicilina/0,005% estreptomicina e 0,025% gentamicina). Enquanto isso, o sangue retirado foi centrifugado uma vez com citrato de sódio a 12% e mais três com a mesma solução em 0,89%, sendo estas centrifugações a 1500 rpm por 15 min, resultando num concentrado de hemácias.

O monitoramento *in vitro*, foi realizado segundo Ramirez e colaboradores (2007) com algumas modificações. De três a seis casais de vermes por condição quimioterápica foram colocados em placas de 24 poços contendo RPMI-1640. O desafio com as drogas se iniciou 24 h após a disposição na placa, e foi adicionado praziquantel (5,15  $\mu$ M) para controle positivo (PICA-MATTOCIA e CIOLI, 2004). Os vermes foram mantidos na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a uma temperatura de 37°C, sendo acompanhados por uma semana, avaliados quanto à motilidade e integridade por meio de microscópio invertido.

A confirmação da morte dos parasitos foi determinada por microscópio de fluorescência com filtro para excitação 360 nm, baseando-se no método de Van der Linden e Deelder (1984), através da incubação dos vermes em solução 1  $\mu$ g/mL diamidinofenilindol (DAPI) em 0,01 M de PBS por uma hora.

### 3.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

#### 3.6.1 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os processamentos dos vermes para a MET e MEV foram realizados segundo Liang e colaboradores (2002), com algumas alterações. As amostras foram lavadas em PBS e fixadas em solução contendo, 5% de glutaraldeído e 4% de paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4. Após a fixação, os vermes foram lavados no mesmo tampão cacodilato e pós-fixados em solução 1% de tetróxido de ósmio e 0,08% ferricianeto de potássio ao abrigo da luz. Tanto a desidratação com acetona como a infiltração em resina Epoxi (Polysciences), foram realizadas em séries. A ultramicrotomia foi executada em facas de diamante em ultramicrótomo Ultracut e Reichert e os cortes coletados em grades de malha 400 nm. A contrastação foi realizada em 5% de acetato de uranila e citrato de chumbo. Por fim, a análise ultraestrutural foi feita em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 109.

#### 3.6.2 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para análise por varredura, as amostras foram fixadas como descrito acima. Após a desidratação em série de acetona (15-100%), os vermes foram secados pelo método do ponto crítico em um aparelho Leica CPD030 e, em seguida metalizados com uma camada de ouro e observados em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390LV.

### 3.7 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE $\beta$ -HEMATINA *IN VITRO*

Por meio de uma reação *in vitro* investigou-se a influência dos fármacos na formação de  $\beta$ -hematina (Hz sintética), baseando-se no princípio apresentado por Egan (2001) e modificações nos métodos descritos por Nhien e colaboradores em 2011. Foram incubados em microtubos 100  $\mu$ M de hemina em NaOH 0,1 M com solução de dodecil sulfato de sódio (SDS) à 30 mM, e o volume das drogas de acordo com concentração de CLQ e DDC. O volume final de 1 mL foi completado com 0,5 M tampão acetato de sódio (pH 4,8).

Após dezesseis horas em estufa à 28°C os tubos foram centrifugados foram 7.000 g por 10 min, posteriormente o precipitado foi ressuscitado em 0,1 M de tampão bicarbonato de sódio com 2,5% de SDS (pH 9.1). Este procedimento foi repetido por mais três vezes, e depois

o precipitado foi diluído em NaOH 0,1 M, quantificando-se a hemina livre ao final do processo por absorvância das amostras em 400 nm no espectrofotômetro de microplaca VERSAmax.

### 3.8 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE HEMOZOÍNA *EX VIVO*

O método para quantificação dos cristais da hemozoína foi realizado baseando-se nos trabalhos de Ncokazi e Egan (2005), e Corrêa Soares e coautores (2009). Aproximadamente 150 fêmeas foram separadas e imersas em 1 mL de água deionizada a temperatura ambiente por 80 min, agitando gentilmente a cada 5min. O sobrenadante, denominado de regurgitado, foi coletado e armazenado em nitrogênio líquido. A quantificação de proteínas do regurgitado foi realizada segundo o método de Lowry (1951).

Alíquotas do regurgitado, contendo 30 µg de proteínas totais, foram incubadas a 37 °C por 18 horas com tampão acetato de sódio 0,5 M (pH 4,8), hemina a 100 µM em NaOH a 0,1 M e as drogas selecionadas, para um volume final de 170 µL. Após o período de incubação, foram adicionados 80 µL de solução de piridina a 30 % em HEPES a 20 mM (pH 7,5), sendo mantida por 15 min a temperatura ambiente. Em seguida, 38 µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa de 96 poços com 250 µL da mesma solução de piridina. Por fim, esta última placa foi usada para quantificar grupos heme livres, lendo as absorvâncias das amostras em espectrofotômetro de microplaca VERSAmax à 450nm.

A quantidade de hemozoína foi determinada, subtraindo a quantidade de hemina adicionada às amostras dos valores encontrados do grupo experimental.

### 3.9 ATIVIDADE DA SUPERÓXIDO DISMUTASE

A extração e concentração da SOD foram realizadas segundo Hong e colaboradores (1992) com modificações. Em torno de 40 casais foram incubados por três horas com e sem as drogas (EL-BASSIOUNI *et al.*, 2007), retirados do RPMI 1640, pesados e imersos em 0,01 M PBS na proporção de 1g de verme para 5 mL.

Em seguida foi adicionado um coquetel de inibidores de proteases ao PBS na concentração final de 1 mM e as amostras foram ultrassonicadas em gelo, três vezes por 30 segundos com amplitude de 80% e intercaladas por 5 segundos. Os homogenatos produzidos foram centrifugadas a 5.000 g a 4°C por 20 min e destas retiradas o sobrenadante.

O sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônio, adicionando 50, 65 e 90% deste sal e centrifugando após cada adição a 4.000 g por 15 min (4 °C), com a remoção do precipitado

em cada passo. Para eliminar resíduos de sulfato de amônio das amostras, estas foram dialisadas por 18 horas a 4°C em 1 L PBS a 10 mM, trocando-se a solução a cada 6 horas em membrana de diálise com poros de 12,4 kDa. As proteínas totais do sobrenadante foram quantificadas pelo método de Lowry (1951).

A atividade da SOD foi analisada de acordo com kit fornecido pela Sigma-Aldrich, que se baseia na competição entre WST-1 (2-(4-iodofenil)3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2-tetrazolium monossódico) e a SOD pelo  $O_2^{\cdot-}$ , o nível de formação de cristais pela redução do WST-1 foi determinada pela leitura da absorbância em espectrofotômetro de microplaca VERSAmax a 450 nm. A quantificação da atividade foi possível por meio de curva padrão de Cu/Zn-SOD humana avaliada sob as mesmas condições.

### 3.10 NÍVEL DE PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Este método foi realizado segundo Corrêa Soares e colaboradores (2009). Amostras correspondendo a 150  $\mu$ L do homogenato de vermes tratados e controles, obtidos segundo o método descrito no item 3.7, foram adicionadas a 200  $\mu$ L de 1% de ácido tiobarbitúrico (TBA) em 50% de ácido acético. As amostras foram incubadas a 100 °C por 15 min e em seguida colocadas em gelo, adicionando 500  $\mu$ L de n-butanol. Após a incubação, foram centrifugadas a 16.000 g por 15 min em temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para medir a concentração de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) com base na absorbância lida à 532 nm no espectrofotômetro de microplaca VERSAmax.

### 3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O teste estatístico utilizado nos experimentos com múltiplos grupos para dados não-paramétricos foi o de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn, e teste ANOVA e pós-teste de Tukey quando a natureza dos dados foram paramétricos. Foi considerado 5% como erro do tipo  $\alpha$ , para verificar diferenças estatisticamente significantes. Todo o referido tratamento de dados foi realizado no programa GraphPad® Prism 5.0.

Para a determinação das doses efetivas das drogas em estudo, foi utilizada a análise de sobrevivência por meio da transformação Probit com correção pelo método de Finney, bem como a avaliação da resposta da combinação ambos realizados no software CompuSyn® segundo método de Chou (2007).

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e o número de repetições dos experimentos está representado como “n” nos resultados.

#### 4. RESULTADOS

##### 4.1. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE EM ESPLÊNOCITOS

Por meio da homogeneização do baço de camundongos Swiss webster foi obtido cultivo de esplenócitos da ordem de  $10^7$ , que foram incubadas e desafiadas por diferentes concentrações de CLQ e DDC. Pela absorbância da quantidade de MTT reduzido foi determinada a toxicidade em relação ao controle após 24 e 48 horas. Desta maneira os gráficos apresentam a viabilidade das células de acordo com o percentual de formazam formado em relação ao controle.

Nas figuras 5 e 6 são apresentados as médias obtidas de 3 experimentos distintos do desafio dos esplenócitos frente a cloroquina por 24 e 48 horas, respectivamente. Os resultados para DDC estão apresentados nas figuras 7 e 8, também representam a média de 3 experimentos distintos para o desafio com a droga após 24 h e 48 h.

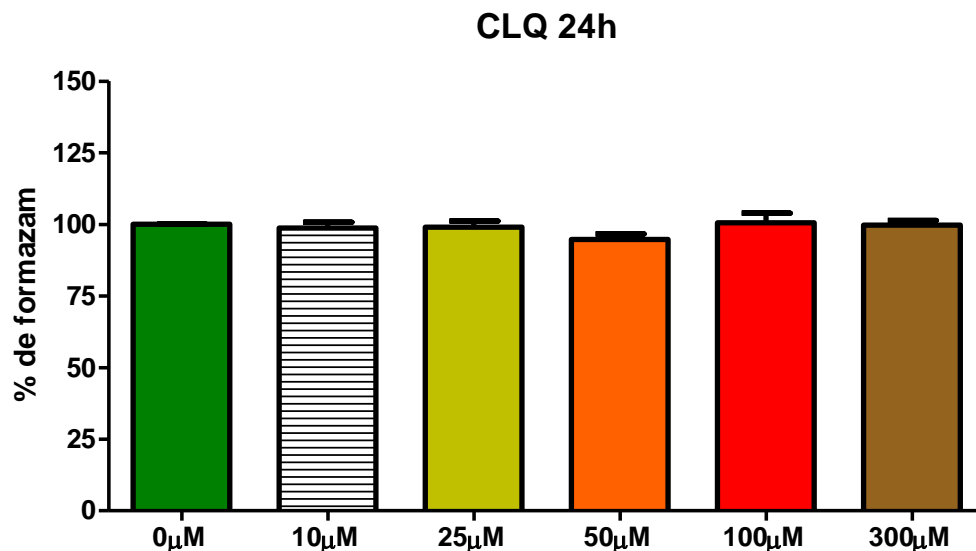


Figura 5: Percentual de viabilidade dos esplenócitos em relação ao controle de acordo com o método da redução do MTT. Não houve diminuição do nível de redução do substrato, demonstrando a presença de células viáveis em relação ao controle para todas as concentrações de CLQ testadas após 24 horas, n=3.

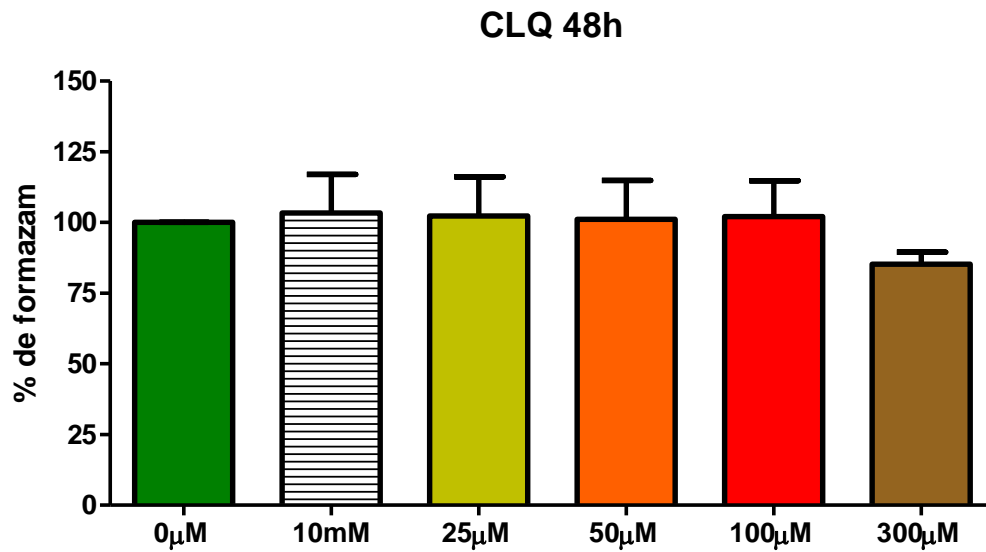


Figura 6: Percentual de viabilidade dos esplenócitos em relação ao controle pelo método redução do MTT após 48 horas de incubação com CLQ em diferentes concentrações. Apesar da diferença entre a concentração de 300μM e o controle, não houve diminuição estatisticamente significativa ( $p > 0,05$  - pós-teste de Dunn)  $n=3$ .

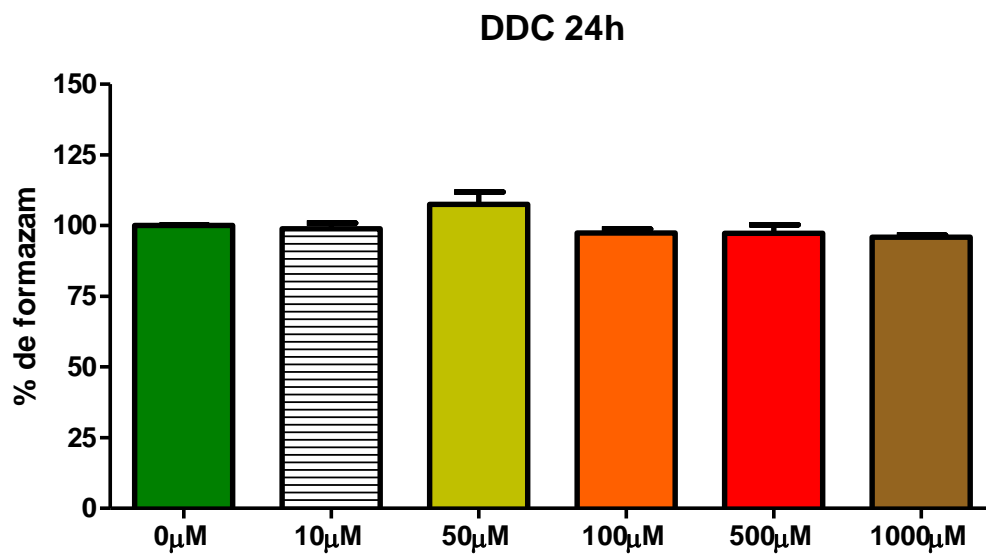


Figura 7: Percentual de viabilidade dos esplenócitos em relação ao controle pelo método de redução do MTT após 24 horas de incubação com DDC. Não houve redução estatisticamente significativa entre os grupos testados quando comparados ao controle ( $p > 0,05$  - pós- teste de Dunn)  $n=3$ .

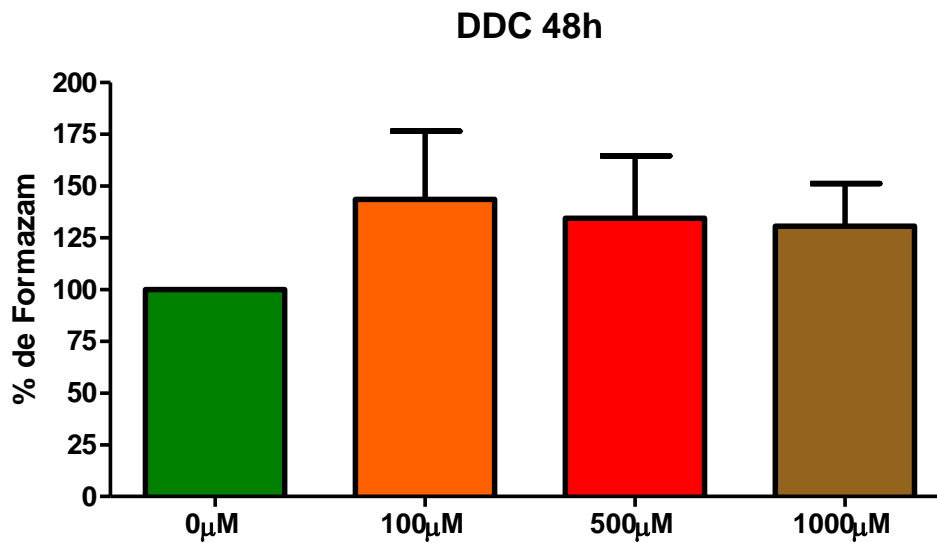


Figura 8: Citotoxicidade segundo o percentual de viabilidade dos esplenócitos em relação controle pelo método de redução do MTT após 48 horas de incubação com DDC. Houve aumento na redução do substrato em todas concentrações testadas de DDC, porém não houve diferença estaticamente significativa ( $p > 0,05$  - pós-teste de Dunn)  $n=3$ .

Os dados apresentados indicam que não ocorreram danos significativos aos esplenócitos das concentrações de CLQ e DDC testadas, o que as tornam viáveis, neste aspecto, para estudos posteriores *in vivo*. A manutenção das células com DDC possibilitou uma maior redução do MTT, o que pode sugerir o fator protetivo desse em células do hospedeiro.

#### 4.2. ANÁLISE DA CURVA DE SOBREVIVÊNCIA *IN VITRO*

A determinação das concentrações efetivas *in vitro* de cloroquina e de dietilditiocarbamato de sódio, para a morte dos vermes de *S. mansoni* foi determinada a partir da análise de sobrevivência cumulativa destes sob efeitos das drogas isoladas. Os experimentos foram acompanhados por 7 dias, onde de quatro a seis casais foram incubados por condição. Ao controle foi adicionado meio de cultura no volume correspondente ao das demais condições. Os dados apresentados correspondem à média de experimentos distintos.



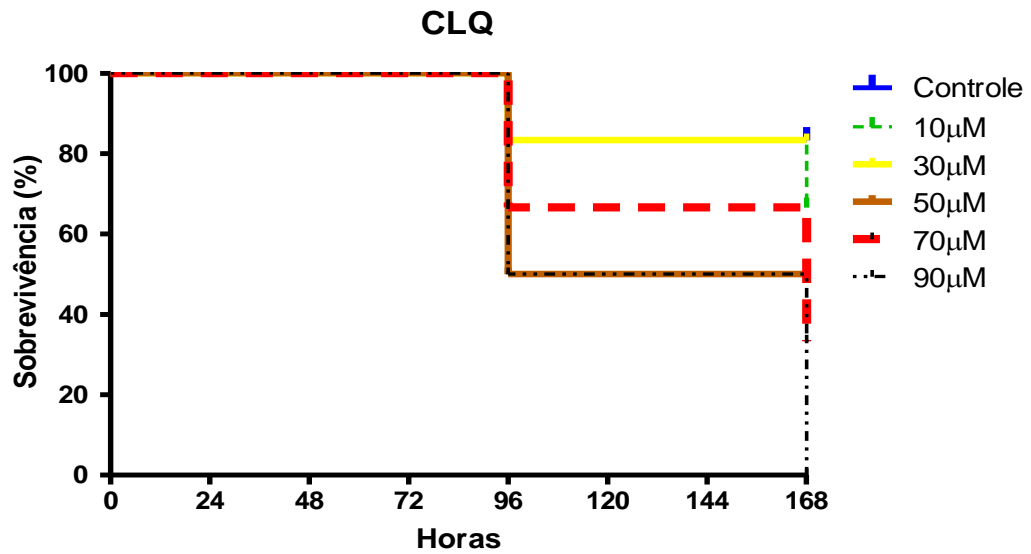


Figura 9: Curvas de sobrevivência *in vitro* para determinação da dose efetiva em 50% (ED50) da CLQ. Controle isento de drogas, seis casais de vermes para cada condição observada. Por meio da transformação de Probit foi estimado o ED50 em **24,3 µM**, n=3.

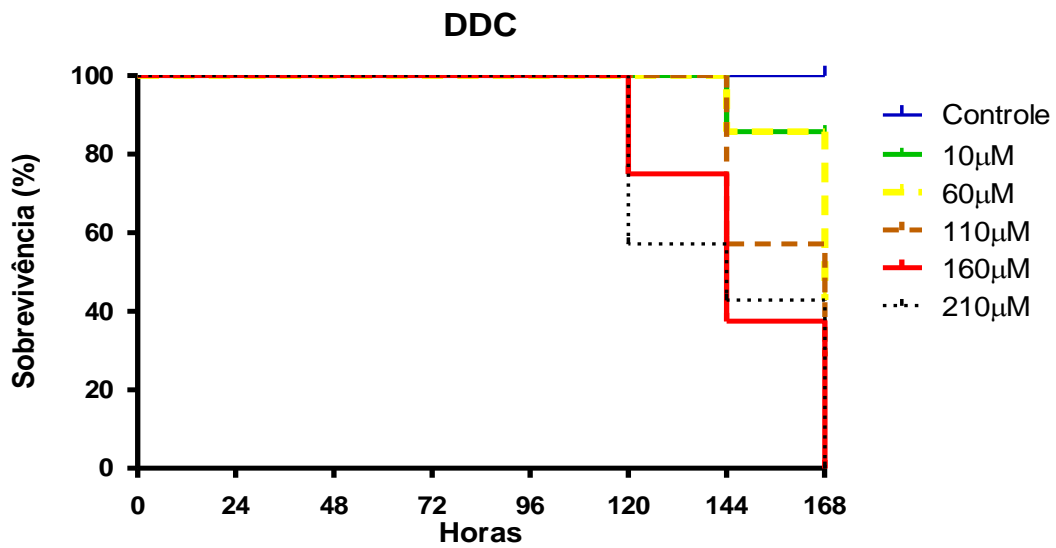


Figura 10: Curvas de sobrevivência *in vitro* para determinação do ED50 do DDC. Controle isento de drogas, seis casais de vermes para cada condição observada. ED50 estimado em **63,1 µM** por análise de Probit, n=3.

Baseando-se nas concentrações testadas no ensaio de citotoxicidade dos esplenócitos, bem como quantidades de CLQ e DDC correspondente ao ED50. Testou-se o efeito combinado utilizando 75% do ED50 como unidade padrão e multiplicando-se essa concentração 2, 3 e 4 vezes, para avaliar indícios de uma proporção mais eficaz diante da sobrevivência dos parasitos. Dessa maneira a unidade de CLQ na proporção foi 19 µM, e 50 µM para DDC.

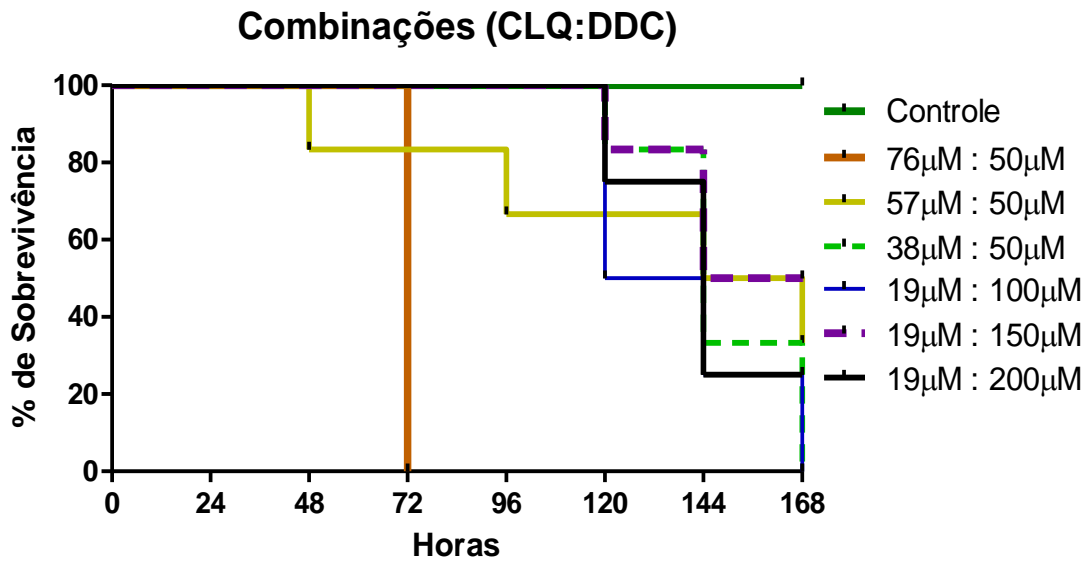


Figura 11: Curvas de sobrevivência *in vitro* para seleção da proporção mais eficiente. Controle isento de drogas, quatro casais de vermes para cada condição observada, n=3.

Após verificar que a proporção 4 unidades de CLQ para 1 unidade de DDC (4:1), se comportou como a proporção de melhor eficiência, deu-se prosseguimento na análise da combinação. Para avaliar a característica do efeito combinado nessa proporção foram adicionadas mais duas concentrações para combinação.

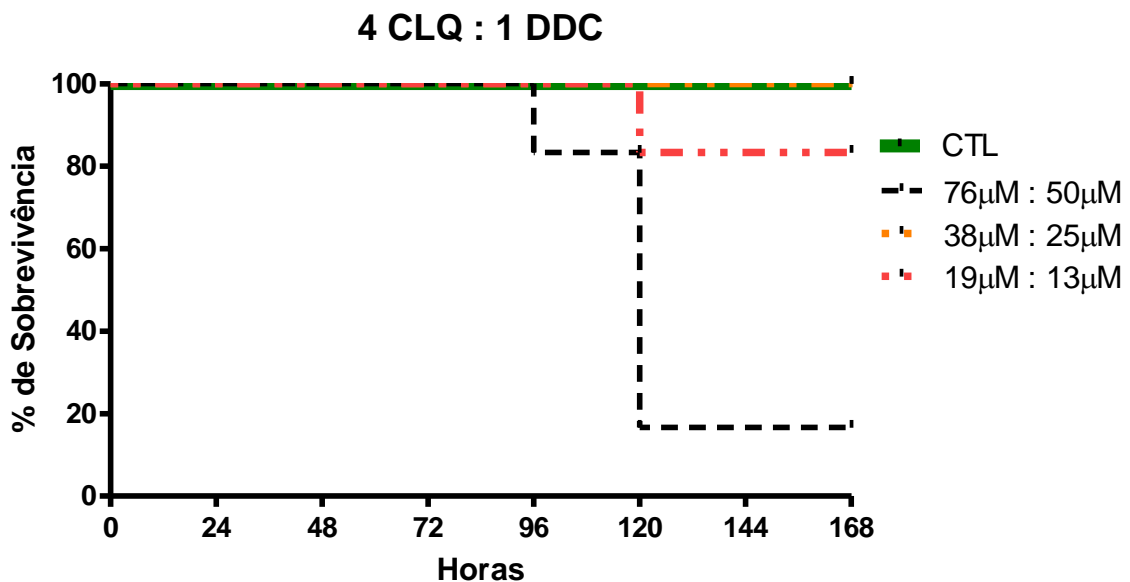


Figura 12: Curvas de sobrevivência *in vitro* para avaliar possível sinergismo em diferentes concentrações na proporção 4 CLQ : 1 DDC, a qual se mostrou mais efetiva. Controle isento de drogas, seis casais de vermes para cada condição observada, n=2.

Por meio do software CompuSyn foi avaliada o tipo de interação da combinação das drogas na morte dos parasitos. No entanto, não existiu, nas condições estudadas, sinergismo entre os efeitos promovidos por CLQ e DDC.

#### 4.3. EFEITOS OBSERVADOS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA

##### 4.3.1. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Por meio da visualização dos vermes pela microscopia eletrônica de varredura avaliou-se as alterações da topografia tegumentar de machos e fêmeas de *S. mansoni* desafiados pela combinação das drogas, bem como do grupo controle sem drogas. Foram utilizados três casais de cada condição para o procedimento.

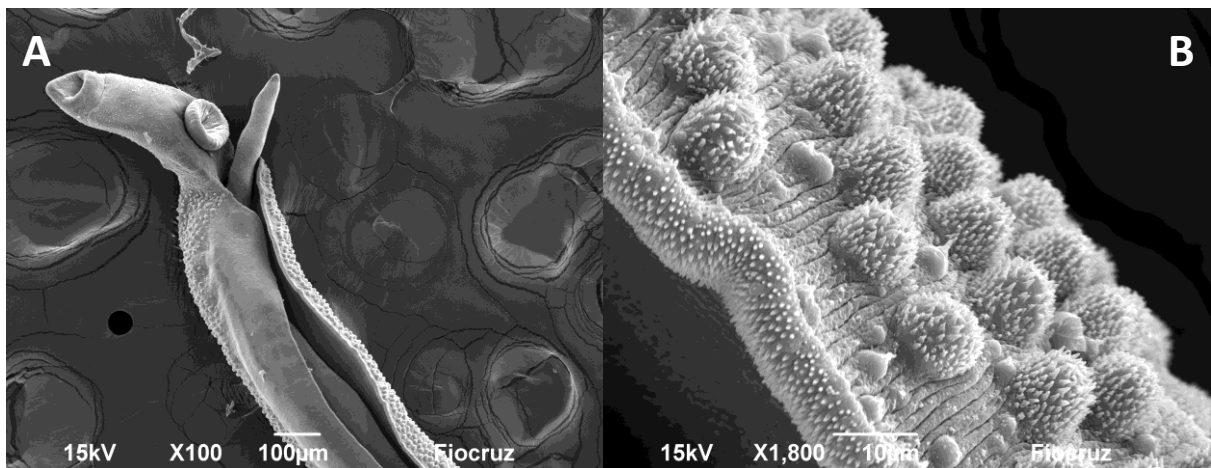


Figura 13: Casal de vermes adultos do grupo controle fixados em copula. Porções anteriores de macho e fêmea, evidenciando a ventosa oral e ventral do macho, enquanto a fêmea se apresenta dorsalmente (A). Detalhe do tegumento do macho, mostrando tubérculos e espinhos íntegros (B).

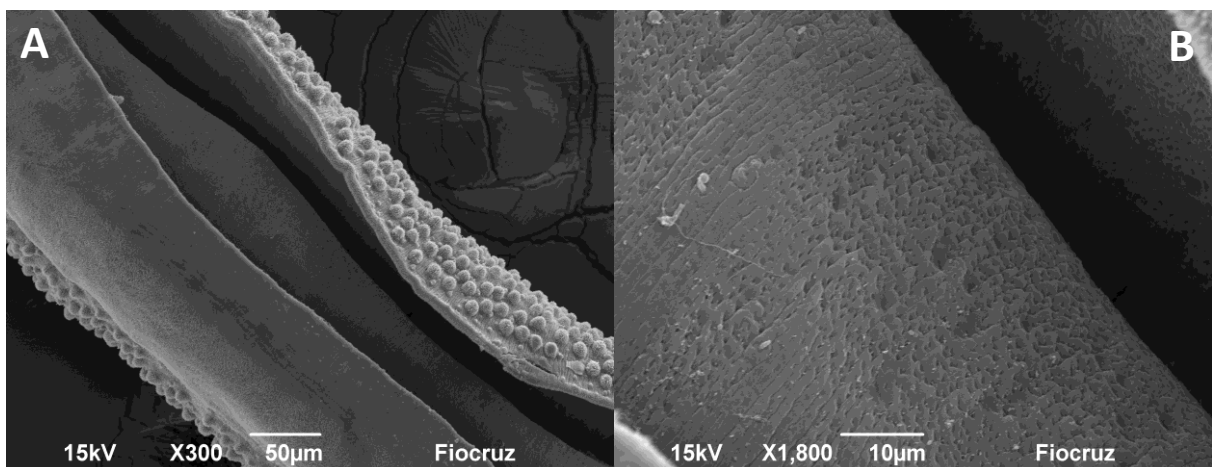


Figura 14: Casal de vermes adultos do grupo controle. Fêmea no canal ginecóforo do macho (A). Detalhe da fêmea que se encontra contorcida, mostrando tegumento íntegro (B).

De acordo com a varredura de elétrons não foi encontrado alterações tegumentares no casal selecionado para estudo, demonstrando que as condições de cultivo não afetam a ultraestruturas dos vermes.

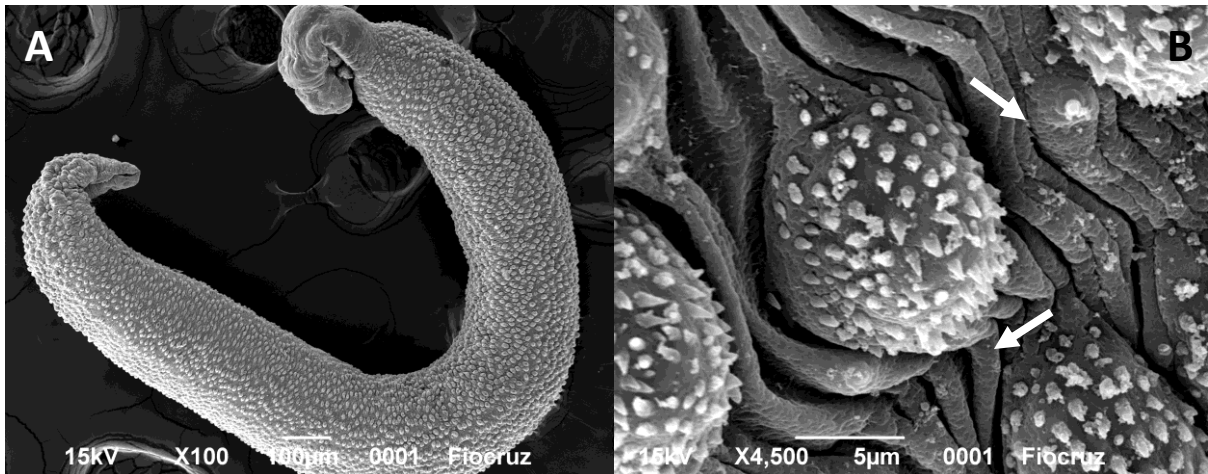


Figura 15: Macho adulto tratado com a proporção 4 CLQ : 1 DDC (38  $\mu$ M de CLQ e 25  $\mu$ M de DDC). Macho visto em menor aumento, apresentando ventosas torcidas e edemaciadas (A). Tubérculos do tegumento masculino edemaciados, o que se evidencia pelo encurtamento dos espinhos e descontinuidade do tegumento, setas brancas (B).

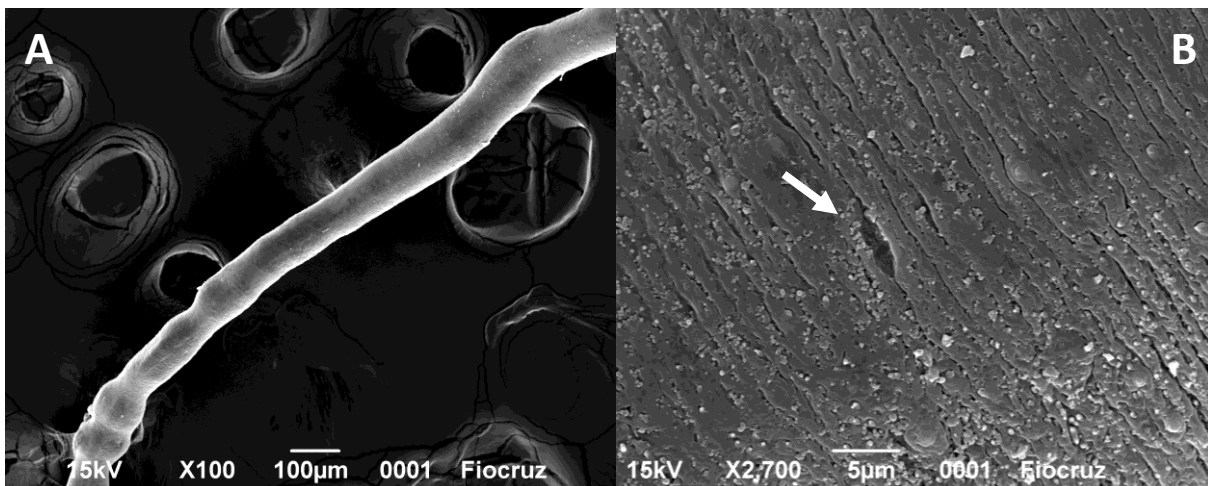


Figura 16: Fêmea adulta tratada com a proporção 4 CLQ : 1 DDC (38  $\mu$ M de CLQ e 25  $\mu$ M de DDC). Vista em menor aumento sem alteração marcante, menos delgada que o controle (A). Tegumento apresentado pontos de descontinuidade, seta branca (B).

Para avaliar as alterações tegumentares dos vermes submetidos ao tratamento, utilizou-se três casais da concentração mediana da proporção 4:1 (38  $\mu$ M de CLQ e 25  $\mu$ M de DDC) na curva sobrevivência. A microscopia eletrônica de varredura demonstrou danos no tegumento dos vermes (macho e fêmea), apresentando evidências das conseqüências dos efeitos provocados pelas drogas.

#### 4.3.2. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Após os testes de sobrevivência, alguns casais também foram processados para microscopia eletrônica como descrito anteriormente, e os cortes obtidos ultrafinos foram analisados por microscopia eletrônica de transmissão.

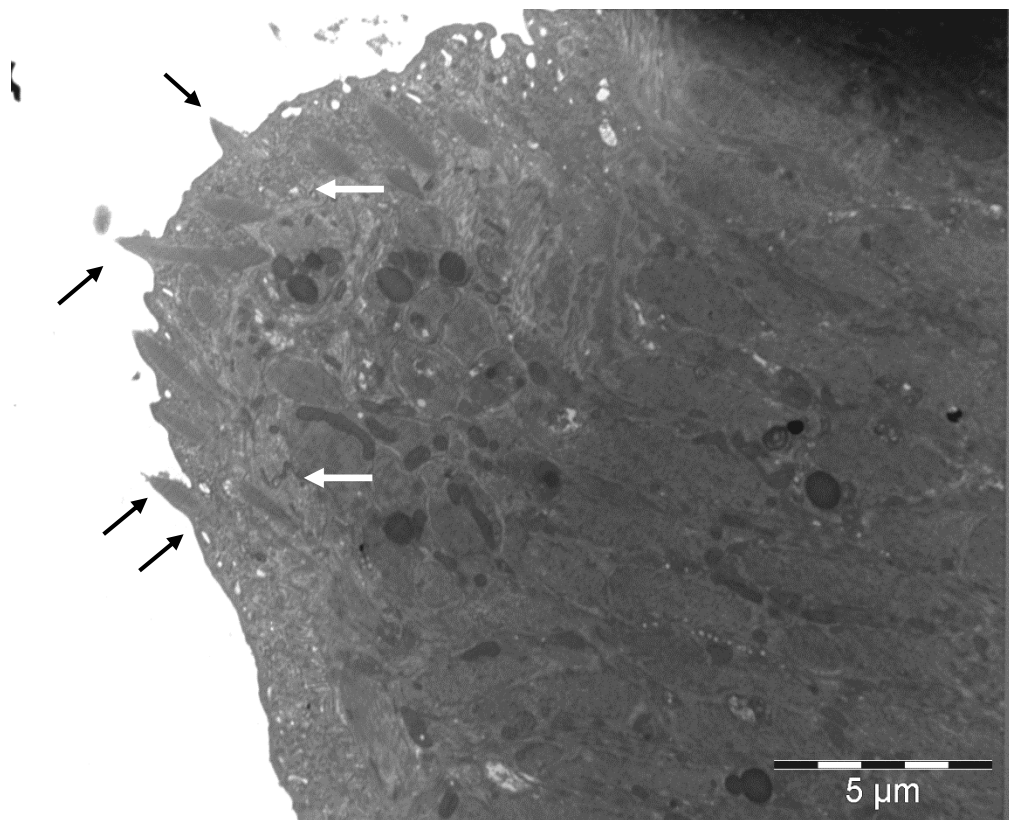


Figura 17: Eletromicrografia do tegumento de macho adulto do grupo controle. O corte do tegumento evidencia tubérculo com espinhos íntegros, setas negras, bem como camada sincicial preservada, setas brancas.

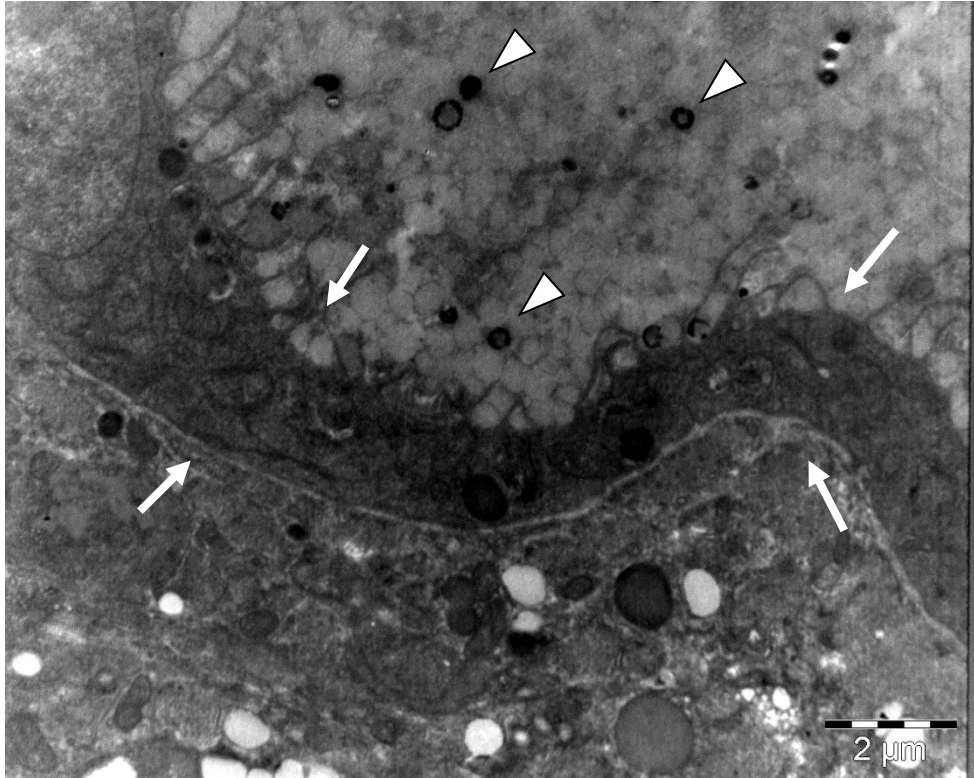


Figura 18: Eletromicrografia do trato digestivo de macho adulto do grupo controle. Onde o tecido parenquimatoso subepitelial apresenta aspecto normal, nota-se a presença de epitélio intestinal preservado (setas brancas), na luz intestinal são encontrados alguns cristais de Hz, completamente formados e incompletos (pontas de setas).

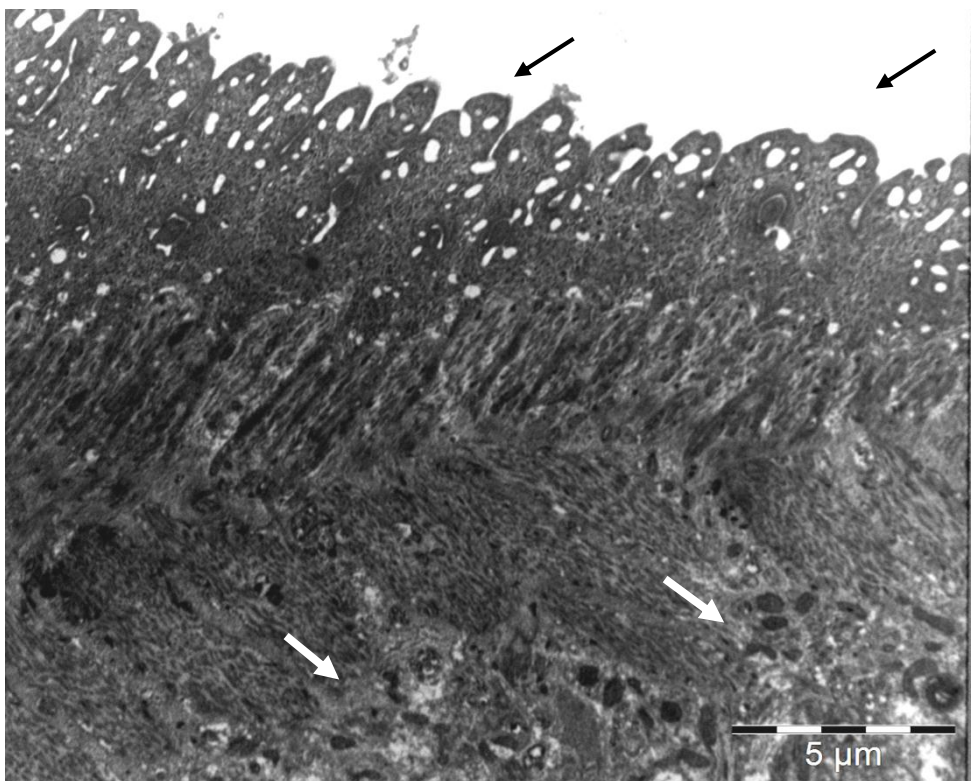


Figura 19: Fêmea adulta do grupo controle apresentando tegumento íntegro, camada sincicial característica (setas pretas), e tecido parenquimatoso normal (setas brancas).

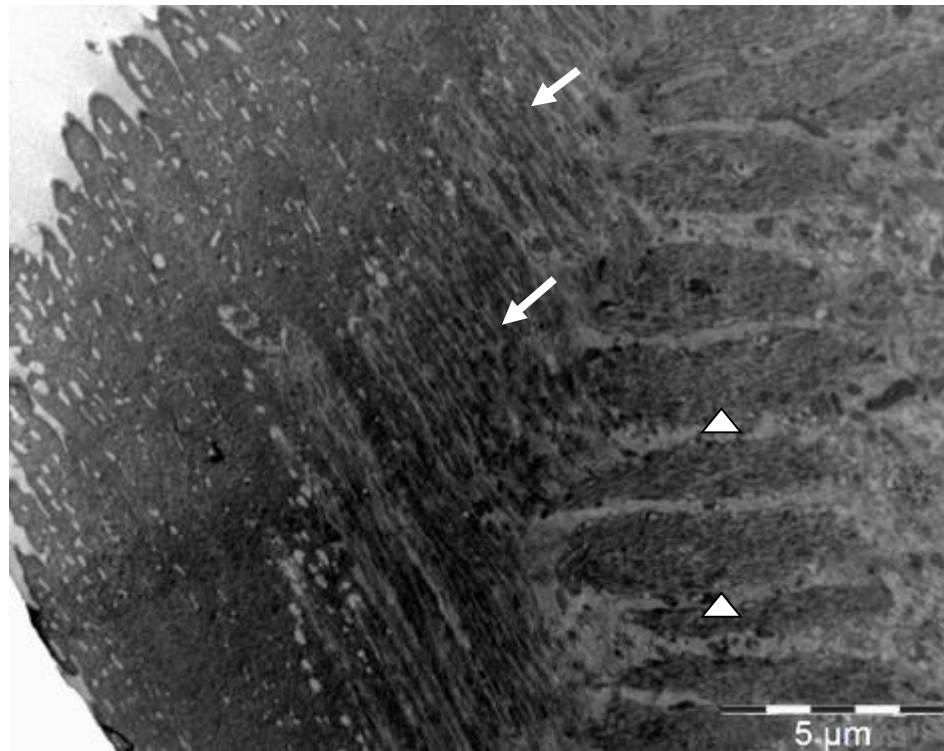


Figura 20: Eletromicrografia da porção tegumentar fêmea adulta do controle, evidenciando camada muscular disposta longitudinalmente, seta branca, e transversalmente (ponta de seta branca). As fibras musculares apresentam eletrodensidade característica.

A avaliação das eletromicrografias obtidas dos vermes do grupo controle demonstrou a integridade do tegumento, camada sincicial com espessura típica e integridade das fibras musculares (Figura 17, 19, 20), bem como do trato digestivo tanto do macho (Figura 18) quanto da fêmea. Enquanto que os vermes submetidos à combinação, demonstrou perda de integridade das fibras musculares e redução do tegumento (Figura 21 e 22).

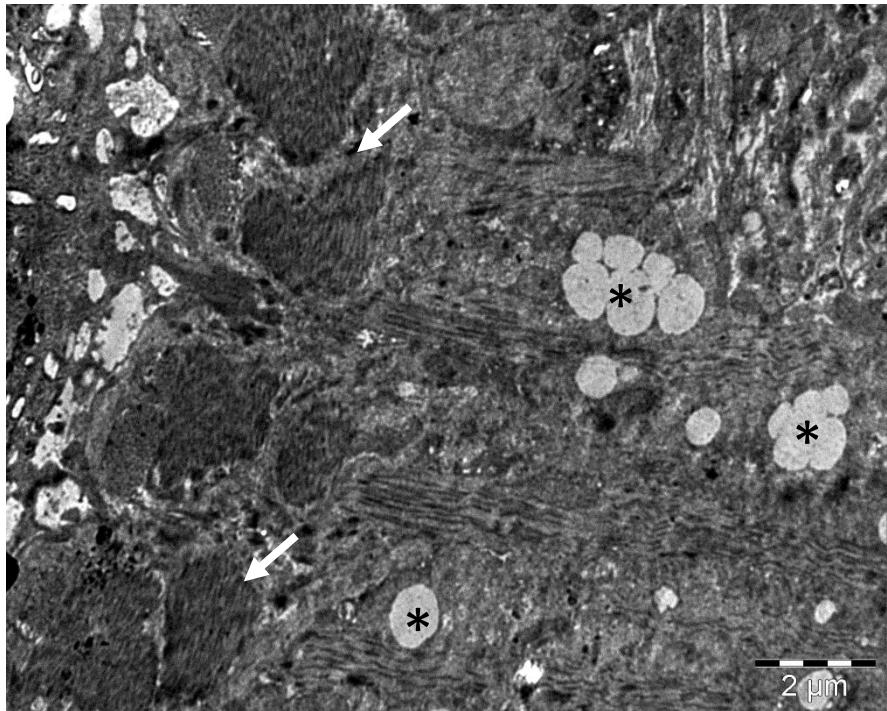


Figura 21: Eletromicrografia de macho adulto submetido à proporção 4:1, 38  $\mu\text{M}$  de CLQ e 25  $\mu\text{M}$  de DDC. Fibras musculares apresentando aumento da eletrodensidade (setas brancas), bem como presença de inclusões lipídicas pelo sincício (\*).

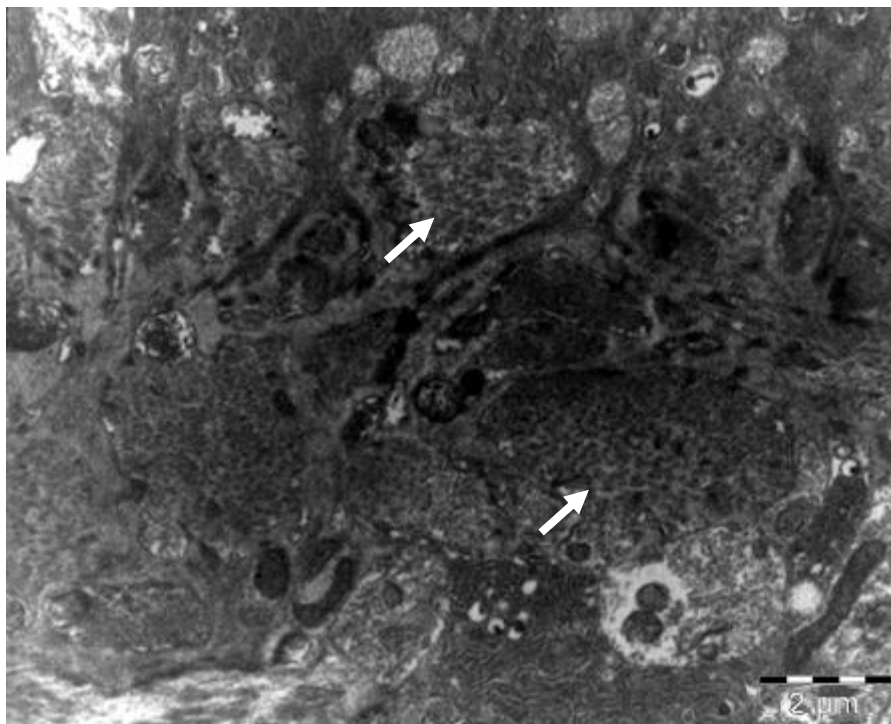


Figura 22: Eletromicrografia de fêmea submetida à proporção 4:1, 38  $\mu\text{M}$  de CLQ e 25  $\mu\text{M}$  de DDC. Pode-se notar presença de fibras musculares desorganizadas e túrgidas (setas brancas).



#### 4.4. ANÁLISE DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE HEMOZOÍNA *EX VIVO*

Diante dos resultados levantados avaliaram-se os mecanismos de ação esperado pelos fármacos na biologia do *S. mansoni*. Desta maneira foi investigada a interferência das drogas na formação de Hz, combinadas e isoladas para permitir a compreensão da interação. Para isso utilizou-se os regurgitados de fêmeas como indutores da cristalização do heme, e este processo foi desafiado pelas drogas. Os gráficos apresentam a média de 2 experimentos distintos.

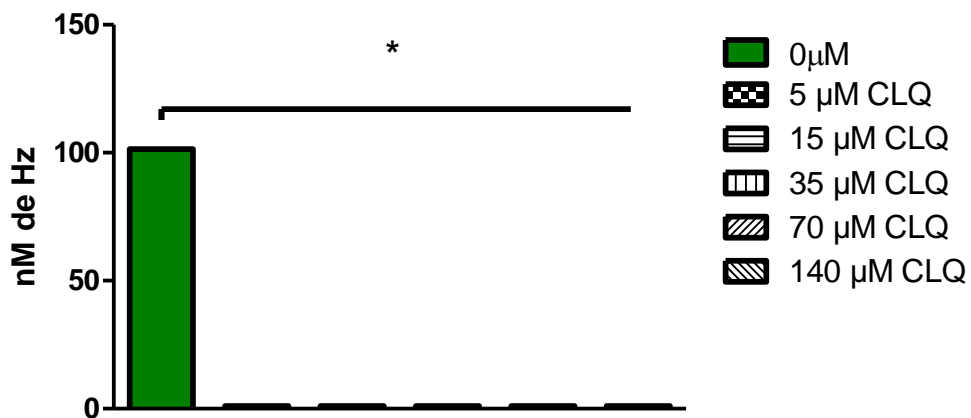


Figura 23: Quantificação de Hz formada quando incubada com CLQ em diferentes concentrações. Em todas as condições com CLQ a formação de hemozoína foi inibida completamente (\*- $p < 0,05$  de acordo com pós-teste de Tukey),  $n=2$ .

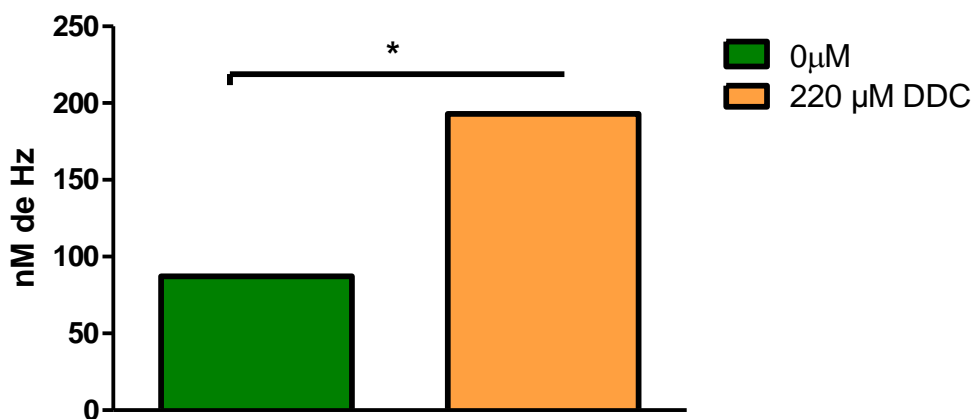


Figura 24: Quantificação de Hz formada *in vitro* incubada com DDC. Houve aumento na formação de Hz em todas as concentrações droga, no entanto, apenas as amostras desafiadas por 220 μM de DDC valores compatíveis nos 2 experimentos realizados (\*- $p < 0,05$  segundo pós-teste de Tukey),  $n=2$ .



Figura 25: Quantificação de Hb formada quando incubada com a combinação de CLQ ao DDC. Todas as associações apresentaram inibição da formação de Hb de maneira semelhante ao encontrado na incubação com CLQ isolada (\*- $p < 0,05$  segundo pós-teste de Tukey),  $n=2$ .

Nos ensaios com CLQ a formação de hemozoína foi inibida completamente, quando isolada ou combinada com DDC. Quando a formação foi desafiada somente por DDC houve aumento da cristalização do heme, possivelmente pelo seu caráter redutor. No entanto, a capacidade de DDC promover a cristalização não impede a atividade da CLQ.

#### 4.5. ANÁLISE DA INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DE $\beta$ -HEMATINA *IN VITRO*

Com intuito de analisar melhor o comportamento das drogas na cristalização do heme, foram realizados testes *in vitro* de formação de  $\beta$ -hematina. Junto às condições artificiais necessárias, descritas na metodologia, para agregação de hemina, adicionou-se diferentes concentrações de CLQ e DDC, a quinidina foi inibidor padrão do ensaio. Os resultados apresentados correspondem a três experimentos repetidos em diferentes tempos.

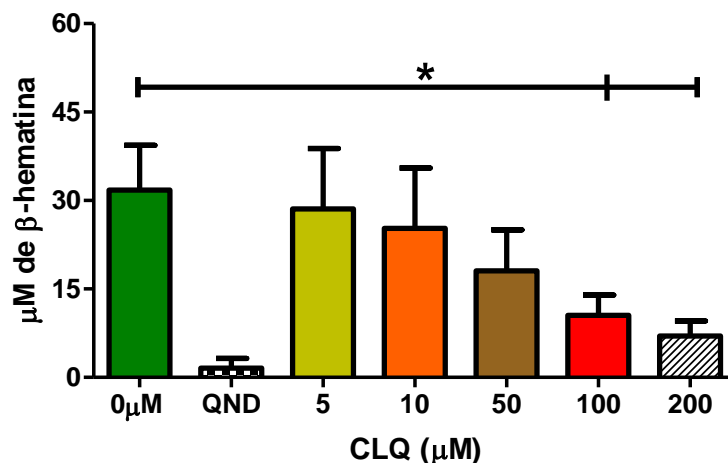


Figura 26: Quantidade de  $\beta$ -hematina formada ao final de 18 horas de incubação. As concentrações de 100 e 200 µM reduz de modo estaticamente significativa a formação em relação ao controle, pós-teste de Tukey (\*- $p < 0,05$ ),  $n=3$ .

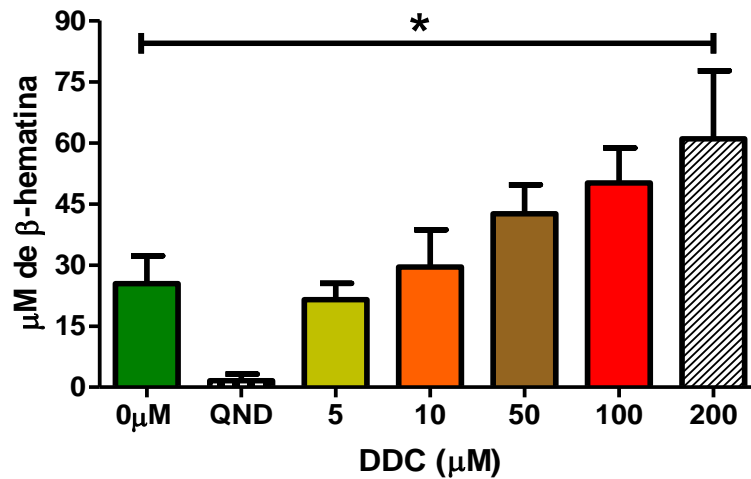


Figura 27: Quantidade de β-hematina após 18 horas de incubação. DDC a 200 µM aumenta significativamente a agregação de heme em relação ao controle (\*- $p < 0,05$  pós-teste de Tukey),  $n=3$ .

Os resultados obtidos da inibição da formação β-hematina os resultados obtidos pelo ensaio de Hz *ex vivo*. Onde CLQ inibe a agregação do heme em diversos modelos, enquanto que o DDC promove a formação de β-hematina e possivelmente Hz.

#### 4.6. QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUPERÓXIDO DISMUTASE

Foram investigados os níveis da SOD do *S. mansoni* pela atividade da enzima na presença e ausência de CLQ. Apesar de não existir diferença significativa entre as quantidades observadas entre os grupos controle e o tratado, ocorreu uma tendência ao aumento dos níveis da enzima nos tratados.

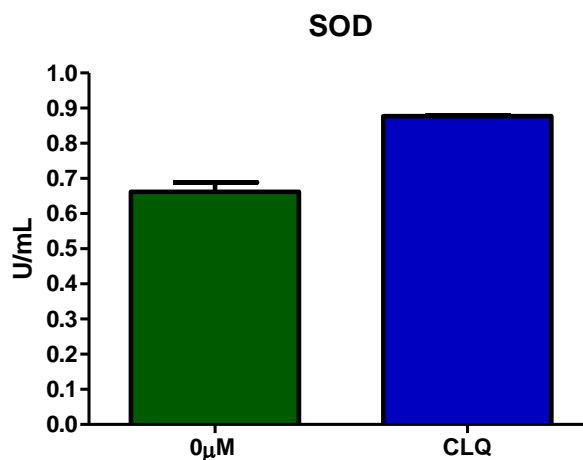


Figura 29: Níveis de SOD encontrados nos vermes incubados por 3 horas. O controle apresentou uma média 0,66 U/mL, enquanto que o grupo tratado apresentou 0,88 U/mL,  $n=1$ .

Em virtude das dificuldades na obtenção de amostra suficiente de vermes para extração de SOD, não foi possível realizar o experimento em outras condições. O resultado apresentado, no entanto sugere um aumento de estresse oxidativo frente à inibição da formação de hemozoína.

#### 4.7. QUANTIFICAÇÃO DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA

Com o intuito de esclarecer os possíveis mecanismos dos danos causados à biologia do *S. mansoni* pela inibição da cristalização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram investigados os níveis de peroxidação lipídica no desafio dos vermes frente à combinação de drogas. Os casais de vermes foram incubados por 3 horas com os fármacos estudados.

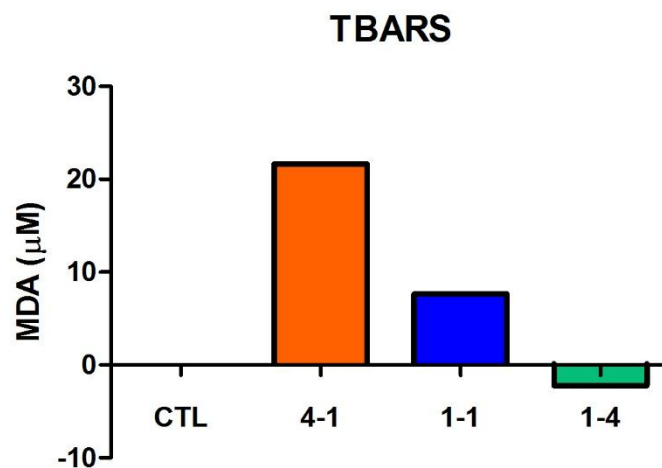


Figura 30: Níveis de malondialdeído, MDA, proporção 4:1 – 76 µM de CLQ por 50 µM de DDC – apresentou 21,6 µM; proporção 1:1 – 38 µM de CLQ por 100µM de DDC – apresentou 7,6 µM; e por ultimo proporção 1:4 – 19 µM de CLQ por 210 µM de DDC – apresentou a leitura negativada, n=1.

Em virtude da necessidade de grande quantidade de vermes para realizar o experimento, só foi possível concluir uma procedimento para determinar o nível de peroxidação lipídica. De todo modo, o resultado encontrado sugere um aumento da oxidação de lipídeos dentro das proporções com maiores concentrações de CLQ, corroborando os indícios apresentados pela quantificação de SOD.

## 5. DISCUSSÃO

A esquistossomose mansônica é uma doença de grande relevância mundial, pois além da sua alta frequência o tratamento está associado à muitos efeitos adversos, bem como a perda

de eficácia ou resistência às drogas utilizadas, praziquantel e oxamniquina (Figura 4). Este cenário torna a busca por novas abordagens terapêuticas, ponto decisivo para a resolução dos problemas que vivem os indivíduos acometidos e principalmente para o transtorno social que a doença desencadeia. Diante disto o objetivo principal desse trabalho foi a averiguar a viabilidade de um regime terapêutico mais eficiente e menos prejudicial para os indivíduos.

Com esse parâmetro, deu-se preferência a reposição de drogas com atividade conhecida para outros modelos e utilidades. Uma vez que as drogas escolhidas são largamente estudadas e utilizadas (BOGUSKI, MANDL e SUKHATME, 2009). Esta medida permite a aplicação e comercialização de uma nova terapia com redução dos custos e tempos aplicados na pesquisa de novas substâncias,

A cloroquina é uma 4-aminoquinolina, antimalárico de grande sucesso, que no *Plasmodium sp.* causa aumento do vacúolo digestivo e aglomeração de cristais de hemozoína (JENSEN e MEHLHORN, 2009). Tendo em vista a homologia entreo *Schistosoma sp.* e *Plasmodium sp.* Para detoxificação do hem, bem como o fato da droga já ter sido utilizada in vivo isoladamente para esquistossomose (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Já foram propostos inúmeros mecanismo de ação para cloroquina (SULLIVAN, 2002), no entanto diversos estudos de espectroscopia apontam para uma complexação entre a droga e o heme, possivelmente uma ligação é coordenada entre o N da droga e Fe(III) da ferriprotoporfirina (Fe(III)PPIX) (EGAN, 2006).

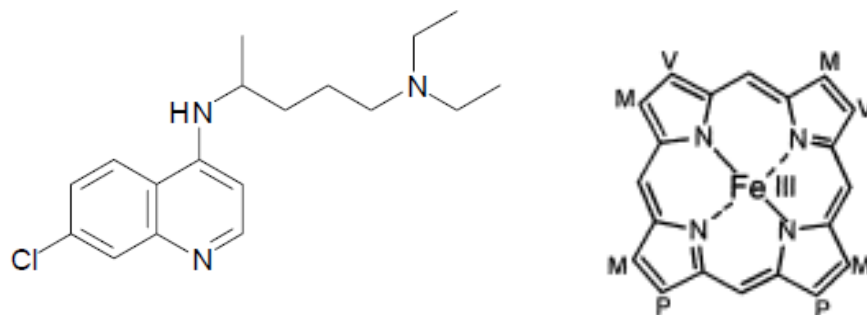


Figura 31: Cloroquina (VILLIERS e EGAN, 2009) e ferriprotoporfirina IX (RYTER e TYRRELL, 1999)

Inicialmente foram realizados ensaios de citotoxicidade em esplenócitos (Figura 5 e 6) que demonstraram que não ocorreu perda estaticamente significativa da viabilidade celular frente a CLQ. Os ensaios de sobrevivência dos vermes demonstram ED50 24,3  $\mu\text{M}$  para CLQ (Figura 9) valor próximo do encontrado *in vivo* por Oliveira e colaboradores em 2004 (aproximadamente 30  $\mu\text{M}$ ).

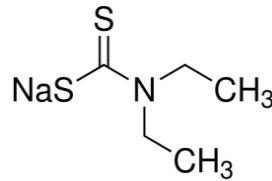


Figura 32: Dietilditiocarbamato de sódio (SIGMA-ALDRICH, 2012).

O dietilditiocarbamato de sódio é o principal metabolito do dissulfiram, historicamente utilizado no tratamento do etilismo (JOHANSSON, 1992). DDC atua como inibidor da SOD, em virtude da sua capacidade em quelar metais de transição (*i.e.*  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) (LUSHCHAK *et al.*, 2005). Além disto a presença de grupos tióis permite realizar pontes dissulfeto que podem inativar enzimas (ARNELLE *et al.*, 1997). O *Schistosoma mansoni* apresenta um diversificado sistema antioxidante onde a SOD desempenha papel crucial, desse modo os vermes foram desafiados com DDC, onde a análise da curva sobrevivência determinou ED50 de 63,1  $\mu\text{M}$  (Figura 9), e o experimento com esplenócitos não demonstrou toxicidade pela droga (Figura 6 e 7), pelo contrário após 48 h de incubação os experimentos indicam que possa aumentar a capacidade de redução das células.

Posteriormente foi avaliada a combinação da cloroquina com dietilditiocarbamato de sódio, que proporcionou um aumento da eficácia na atividade esquistossomicida, pois na proporção 4 CLQ : 1 DDC (76  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  respectivamente) apresentou a mesma letalidade em tempo e concentrações menores de quando utilizadas isoladamente (Figura 11).

Por meio do estudo microscópio eletrônico dos casais tratados com a combinação na proporção 4:1 (Figura 12-21), destacou-se alterações no tegumento de ambos os sexos, mostrando que houve danos na síntese do tegumento, bem como na musculatura do parasito. Os agravos descritos resultam, possivelmente, do estresse oxidativo promovido pela liberação de heme, aliado à inibição da SOD.

Os resultados de inibição da formação de Hz induzida pelo regurgitado de fêmeas quando incubadas com CLQ (Figura 23), bem como dos ensaios *in vitro* de formação de  $\beta$ -hematina (Figura 26) confirmaram os dados de trabalhos anteriores (EGAN e NCOKAZI, 2005; CORRÊA-SOARES *et al.*, 2007; NHIEN *et al.*, 2011). Demonstrando que a CLQ de fato inibe a agregação do heme, e conseqüentemente causa danos ao parasito levando-o a morte.

A incubação de DDC no ensaio de formação de Hz não inibiu a produção dos cristais de heme, pelo contrário promoveu a agregação de hemina (Figura 26). Tal resultado também se repetiu nas concentrações mais altas do ensaio *in vitro* e o aumento foi estatisticamente significativo para a concentração 200  $\mu\text{M}$  quando comparado ao controle. Tais resultados

podem ser justificados pelo trabalho apresentado por Villiers e colaboradores (2007), onde demonstrou-se que a dimerização do heme pode ocorrer pela ligação axial  $H_2O.Fe(III)PPIX / OH.Fe(III)PPIX$ , desta forma o DDC pode criar um ambiente redutor capaz de auxiliar a agregação do heme e assim aumentar a cristalização em relação ao controle.

Apesar do DDC promover agregação de heme no ensaio *ex vivo*, quando combinada com CLQ, não interferiu na atividade desta. A figura 24 apresenta os resultados de todas as concentrações das combinações testadas, demonstrando que a cristalização de H<sub>z</sub> foi inibida completamente. Quanto ao efeito da combinação sobre a peroxidação lipídica dos vermes, pode-se ressaltar, que apesar de ter sido realizado apenas um experimento, a proporção 4 CLQ : 1 DDC foi a que causou maior dano aos componentes lipídicos (Figura 28), o que sugere a capacidade dessa proporção de induzir estresse oxidativo.

Diversos estudos e revisões apontam que a origem dos danos causados pelo heme livre se deve a sua capacidade em produzir ERO, que por sua vez podem causar danos em ácidos nucléicos, carboidratos, lipídeos e proteínas (RYTER e TYRRELL, 1999; KUMAR e BANDYOPADHYAY, 2005; STIEBLER *et al.*, 2011). De acordo com essas informações a quantificação de SOD extraída dos vermes tratados com CLQ (Figura 28), sugere uma resposta do sistema antioxidante do *S. mansoni* diante do estresse oxidativo promovido.

Essas evidências são apoiadas pelos resultados obtidos por Oliveira e co-autores (2002), onde o heme teve maior capacidade de induzir peroxidação lipídica e oxidação de carboidratos, que os cristais de hemozoína. Do mesmo modo, El-Bassiouni e colaboradores em 2007 demonstraram que o artemeter, antimalárico atualmente empregado, provocou peroxidação lipídica nos vermes de *Schistosoma mansoni* e induziu aumento da expressão de SOD.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do trabalho exposto a combinação de cloroquina e dietilditiocarbamato de sódio é uma possibilidade terapêutica para o tratamento da esquistossomose mansônica. Primeiramente por que as drogas não causaram danos às células dos hospedeiros do modelo experimental utilizado. Desta maneira, a combinação é viável para aplicação deste tratamento em estudos *in vivo*.

A concentração da dose efetiva das drogas para combater o parasito foi muito inferior as concentrações testadas para citotoxicidade, bem como foi demonstrado por microscopia eletrônica que a natureza dos danos são a causa da morte dos parasitos. A análise da formação

de Hz permite inferir que a associação de CLQ e DDC aumentam a presença de hme livre, o principal causador dos efeitos deletérios ao parasito.

Deve-se ainda considerar que os fármacos atuam em diferentes vias no *Schistosoma mansoni*, as evidências de peroxidação lipídica e quantificação da atividade de superóxido dismutase apontam que a inibição do sistema antioxidante do parasito soma-se ao efeito nocivo da liberação de heme no organismo do parasito.

De acordo com o apresentado, torna-se evidente o potencial terapêutico da combinação de cloroquina e dietilditiocarbamato de sódio. Essa nova abordagem terapêutica deve ser avaliada por ensaios *in vivo*, como primeiro passo para o desenvolvimento deste tratamento para esquistossomose mansônica.



## REFERÊNCIAS

- AFT, R. L.; MUELLER G. C. Hemin-mediated DNA strand scission. **J. Biol. Chem.** v. 258, p.12069–12072, 1983.
- ALGER HM, WILLIAMS DL. The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. **Mol. Biochem. Parasitol.** v. 121, n. 1, p.129-139, 2002.
- AMARAL, R. S. *et al.* An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 101, p.13-19, 2006.
- ANDRADE, Z. A. *et al.* Hepatic lesions caused by hycanthone (etrenol). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo,** v. 16, p.160-170, 1974.
- ANDRADE, Z. A.; PRATA, A. Asymptomatic schistosomiasis studied by needle biopsy of the liver. **Am. J. Trop. Med. Hyg.,** v. 5, p.236-242, 1963.
- ANDRADE, Z. Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression. **Acta Trop.,** v. 108, p.79-82, 2008.
- ARAÚJO, N. Association of oxamniquine praziquantel and clonazepam in experimental Schistosomiasis mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.,** v. 103, p.781-785, 2008.
- ARNELLE, D.R.; DAY, B.J.; STAMLER, J.S. Diethyldithiocarbamate induced decomposition of s-nitrosothiols. **Nitric Oxide,** v.1, p.56–64, 1997.
- ARRUDA, M. A.; GRAÇA-SOUZA, A. V.; BARJA-FIDALGO, C. Heme and innate immunity: new insights for an old molecule. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v.100, p.799-803, 2005.
- BAHIA, D.; *et al.* The distribution of motor proteins in the muscles and flame cells of *Schistosoma mansoni* miracidium and primary sporocyst. **Parasitology,** v.133, p.321-329, 2006.
- BARBOSA, C. S. *et al.* Epidemiologia e controle da esquistossomose mansônica. In: CARVALHO, LENZI. (Orgs.). **Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma Visão Multidisciplinar.** 1º ed. Rio Janeiro: Fiocruz, 2008, p.965-1008, v. 1.
- BARBOSA, FS; PEREIRA DA COSTA, D.P. Incapacitating effect of *Schistosoma mansoni* on the productivity of sugar-cane cutters in north-eastern Brazil. **Am. J. Epid.,** v. 114, p.102–111, 1981.
- BAYNE, C.J. Successful parasitism of vector snail *Biomphalaria glabrata* by the human blood fluke (trematode) *Schistosoma mansoni*: a 2009 assessment. **Mol. Biochem. Parasitol.,** v.165, p.8–18, 2009.
- BENDER, R. C.; *et al.* Variation in expression of *Biomphalaria glabrata* SOD1: A potential controlling factor in susceptibility/resistance to *Schistosoma mansoni*. **Dev. Comp. Immunol.,** v.31, p.874–878, 2007.

BOGUSKI, M. B.; MANDL, K. D.; SUKHATME, V. P. Repurposing with a Difference. **Science**, v. 324, n.5933, p.1394-1395, 2009.

BOTROS, S. S. *et al.* Antischistosomal activity of hexadecyloxypropyl cyclic 9-(S)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy) propyl]adenine and other alkoxyalkyl esters of acyclic nucleoside phosphonates assessed by schistosome worm killing *in vitro*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, p.5284-5287, 2009.

BOULANGER, D. *et al.* Immunization of mice and baboons with the recombinant Sm28GST affects both worm viability and fecundity after experimental infection with *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunol.**, v. 13, p.473-490, 1991.

CAFFREY, C. R.; GSELL, C.; RUPPEL, A. *Schistosoma japonicum* is less sensitive to cyclosporin A *in vivo* than *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v. 85, p.736-739, 1999.

CALDAS, I. R. *et al.* Human schistosomiasis mansoni: immune responses during acute and chronic phases of the infection. **Acta Trop.**, v. 108, p.109-117, 2008.

CANDANEDO-GUERRA, R. *et al.* Ecological analysis of acari recovered from coprolites from archaeological site of northeast Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, p.181-190, 2003.

CAPRON, A. *et al.* Schistosomes: the road from host-parasite interactions to vaccines in clinical trials. **Trends Parasitol.**, v. 21, p.143-149, 2005.

CARMO, E. H.; BARRETO, M. L. Esquistossomose Mansônica no Estado da Bahia, Brasil: Tendências Históricas e Medidas de Controle. **Cad. Saude Publica.**, v. 10, p.425-439, 1994.

CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma Visão Multidisciplinar**. 1º ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008. v.1.

CHEEVER, A. W. A quantitative post mortem study of *Schistosomiasis mansoni* in man. **Journal of Trop. Med. and Hyg.**, v. 17, p.38-64, 1968.

CHEN, M. M.; SHI, L.; SULLIVAN D. J. JR. Haemoproteus and Schistosoma synthesize heme polymers similar to Plasmodium hemozoin and beta-hematin. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 13, p.1-8, 2001.

CHIUMIENTO, L.; BRUSCHI, F. Enzymatic antioxidant systems in helminth parasites. **Parasitol. Res.**, v. 105, p.593-603, 2009.

CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacol. Rev.**, v. 58, p.621-681, 2007.

COELHO, P. M. Z. *et al.* Evolução do *Schistosoma mansoni* no hospedeiro intermediário. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. Z.; LENZI, H. L. (Orgs.). **Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma Visão Multidisciplinar**. 1 ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2008, p.148-160, v. 1.

COLLINS, J. J. et al. An Atlas for *Schistosoma mansoni* Organs and Life-Cycle Stages Using Cell Type-Specific Markers and Confocal Microscopy. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, p.1-17, 2011.

CORRÊA SOARES, J. B. et al. Extracellular lipid droplets promote hemozoin crystallization in the gut of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **FEBS Lett.**, v.581, p.1742– 1750, 2007.

CORRÊA SOARES, J. B. et al. Interference with hemozoin formation represents an important mechanism of schistosomicidal action of antimalarial quinoline methanols. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v.3, p.1-16, 2009.

COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 1º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.931-946, v.1.

COURA, J. R., CONCEIÇÃO, M. J. Specific schistosomiasis treatment as a strategy for disease control. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, p.598-603, 2010.

COURA, J. R.; R. S. AMARAL. Epidemiological and Control Aspects of Schistosomiasis in Brazilian Endemic Areas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 99, p.13-19, 2004.

COUTINHO ABATH, E.; MAGALHÃES FILHO, A.; JAMPOLSKY R. On the histology and histochemistry of probable reactions of hypersensitivity observed in *Schistosomiasis mansoni*. **Rev. Latinoam Anat. Patol.**, v. 4, p.25-35, 1960.

COUTINHO, A. Editorial: a new dynamic approach to the diagnosis of Symmers fibrosis in schistosomiasis by ultrasound. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 32, p.73-77, 1990.

DA'DARA, A.; et al. Metabolite movement across the schistosome surface. **J. Helminthol.**, v. 86, n. 2, p.141-147, 2012.

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

DAVID, A. R. 5000 years of schistosomiasis in Egypt. **Chungara**, v. 32, p.133– 135, 2000.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21, p.659-667, 2008.

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

EGAN, T. J. et al. Fate of haem iron in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Biochem. J.**, v. 365, p.343-347, 2002.

EGAN, T. J. Interactions of quinoline antimalarials with hemozoin in solution. **J. Inorg. Biochem.**, v.100, p.916-926, 2006.

EGAN, T. J. et al. Hemozoin (beta-hemozoin) biomineralization occurs by self-assembly near the lipid/water interface. **FEBS Lett.**, v. 580, p.5105-5110, 2006.

EGAN, T. J. Haemozoin formation. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 157, p.127-136, 2008.

EGAN, T.J.; MAVUSO, W. W.; NCOKAZI K. K. The mechanism of beta-hematin formation in acetate solution. Parallels between hemozoin formation and biomineralization processes. **Biochemistry**, v.40, p.204-213, 2001.

EGAN, T. J.; NCOKAZI, K. K. Quinoline antimalarials decrease the rate of beta-hematin formation. **J. Inorg. Biochem.**, v. 99, p.1532-1539, 2005.

EL-BASSIOUNI, E. A; *et al.* Modulation of antioxidant defence in different developmental stages of *Schistosoma mansoni* by praziquantel and arthemeter. **Br. J. Biomed. Sci.**, v. 64, p.168-173, 2007.

FERRARI, M. L. *et al.* Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bull World Health Organ.**, v. 81, p.190-196, 2003.

FERREIRA, I. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. **Rev. Pat. Trop.**, v.36, p.67-74, 2007.

FERREIRA, L. F.; ARAÚJO, A. J. G.; CONFALONIERI, U. **Paleoparasitologia no Brasil.** Rio de Janeiro: PEC/ENSP, p.158, 1988.

FITCH, C. D.; KANJANANGGULPAN, P. The state of ferriprotoporphyrin IX in malaria pigment. **J. Biol. Chem.**, v.262, p.15552-15555, 1987.

FOURNIER, A.; THÉRON, A. Sectorisation morpho-anatomique et fonctionnelle du sporocyste-fils de *Schistosoma mansoni*. **Z. Parasitenkd.**, v.71, p.325-336, 1985.

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annu. Rev. Biochem.**, v.64, p.97-112, 1995.

GOBERT, G.N.; *et al.* The ultrastructural architecture of the adult *Schistosoma japonicum* tegument. **Int. J. Parasitol.** V.33, n. 14, p.1561-1575, 2003.

GRABE, K.; HAAS, W. Navigation within host tissues: *Schistosoma mansoni* and *Trichobilharzia ocellata* schistosomula respond to chemical gradients. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p.927-934, 2004.

GRYSSEELS, B. *et al.* Human schistosomiasis. **Lancet**, v.368, p.1106-1118, 2006.

GUIMARÃES, I. C. S.; TAVARES-NETO J. Transmissão urbana da esquistossomose em crianças de um bairro de Salvador, Bahia. **Rev. da Soc. Bras. de Med. Trop.**, v. 5, p.451-455, 2006.

GUTTERIDGE, J. M.; HALLIWELL, B. Iron toxicity and oxygen radicals. **Baillieres Clin. Haematol.**, v. 2, p.195-256, 1989.

- HAAS, W.; HAEBERLEIN, S.; BEHRING, S.; ZOPPELLI E. *Schistosoma mansoni*: human skin ceramides are a chemical cue for host recognition of cercariae. **Exp. Parasitol.**, v. 120, p.94-97, 2008.
- HAEBERLEIN, S.; HASS, W. Chemical attractants of human skin swimming *Schistosoma mansoni* cercariae. **Parasitol. Res.**, v. 102, p.657-662, 2008.
- HARTER-LAILHEUGUE, S.; BOUCHET, F. Palaeoparasitological study of atypical elements of the low and High Nile Valley. **Bull Soc. Pathol. Exot.**, v.99, p.53-57, 2006.
- HOANG, A. N. *et al.* Crystallization of synthetic haemozoin (beta-haematin) nucleated at the surface of lipid particles. **Dalton Trans.**, v.39, p.1235-1244, 2010.
- HOKKE, C. H.; FITZPATRICK, J. M.; HOFFMANN K. F. Integrating transcriptome, proteome and glycome analyses of *Schistosoma* biology. **Trends Parasitol.**, v.23, p.165-174, 2007.
- HOLY, J. M. *et al.* Immunocytochemical localization of major glutathione S-transferase in adult *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**, v.75, p.181-190, 1989.
- HONG, Z. *et al.* Identification and Purification of a Second Form of Cu/Zn Superoxide Dismutase from *Schistosoma mansoni*. **Infect. and immun.**, v. 60, p.3641-3651, 1992.
- HOTEZ, P. J.; *et al.* Helminth infections: soil-transmitted helminth infections and schistosomiasis. BREMAN, J.G.; *et al.* (Orgs.). **Disease Control Priorities in Developing Countries**. 2. ed. Washington: World Bank. 2006, p.467-482.
- HUANG, H.H.; RIGOUIN, C.; WILLIAMS, D.L. The redox biology of schistosome parasites and applications for drug development. **Curr Pharm Des.** v.18, p.3595-3611. 2012.
- JESUS, A. R.; *et al.* Association of type 2 cytokines with hepatic fibrosis in human *Schistosoma mansoni* infection. **Infect. Immun.**, v.72, p.3391-3397, 2004.
- JENSEN, M.; MEHLHORN, H. Seventy-five years of Resochin in the fight against malaria. **Parasitol. Res.** v.3, p.609-627, 2009.
- JOHANSSON, B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. **Acta Psychiatr Scand. Suppl.** v.86, p.15-26, 1992.
- JOHANSSON, L.; GAFVELIN, G.; ARNÉR, E.S. Selenocysteine in proteins-properties and biotechnological use. **Biochim Biophys Acta.** v.1726, n.1, p.1-13, 2005.
- KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Ciência e Cultura**, v.55, p.38-41, 2003.
- KATZ, N.; COELHO P.M. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: the Brazilian contribution. **Acta Trop.**, v.108, p.72-78, 2008.

- KEISER, J.; MANNECK, T.; VARGAS M. Interactions of mefloquine with praziquantel in the *Schistosoma mansoni* mouse model and *in vitro*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.66, p.1791-1797, 2011.
- KING, C. H. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. **Chronic Illn.s**, v.4, p.65-79, 2008.
- KLOSS, H.; et al. A Socioeconomic Studies of Schistosomiasis in Brazil: a Review. **Acta Trop.**, v.108, p.194-201, 2008.
- KOHN, A. B. *et al.* Specific sites in the Beta Interaction Domain of a schistosome Ca<sup>2+</sup> channel beta subunit are key to its role in sensitivity to the anti-schistosomal drug praziquantel. **Parasitology**, v. 127, p.349-356, 2003.
- KRAUTZ-PETERSON, G. *et al* Amino Acid Transport in Schistosomes characterization of the permease heavy chain sprm1hc. **J. Biol Chem.**, v.282, p.21767-21775, 2007.
- KRAUTZ-PETERSON, G. *et al.* Suppressing Glucose Transporter Gene Expression in Schistosomes Impairs Parasite Feeding and Decreases Survival in the Mammalian Host. **PLoS Pathog.**, v.6, 2010.
- KUMAR, S.; BANDYOPADHYAY, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. **Toxicol. Lett.**, v.157, p.175-188, 2005.
- KUNTZ, A. N. *et al.* Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: An Essential. Parasite Enzyme and a Key Drug Target. **Plos Med.**, v.4, p.1071-1086, 2007.
- KWATIA, M.A.; BOTKIN, D.J.; WILLIAMS, D. L. Molecular and enzymatic characterization of *Schistosoma mansoni* thioredoxin peroxidase. **J. Parasitol.**, v. 86, p.908-915, 2000.
- LAMBERTH, J. D. Nox enzymes and the biology of reactive oxygen. **Nat. Rev. Immunol.**, v.4, p.181-189, 2004.
- LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. **Acta Trop.**, v.77, p.101-109, 2000.
- LAMBERTUCCI, J. R.; Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.105, p.422-435, 2010.
- LEHR, *et al.* Localization of carbohydrate determinants common to *Biomphalaria glabrata* as well as to sporocysts and miracidia of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v.135, p.931-942, 2008.
- LENZI, H. L. *et al.* Migração e desenvolvimento de *Schistosoma mansoni* no hospedeiro definitivo. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P.M. Z.; LENZI, H. L. (Orgs.). **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma Visão Multidisciplinar**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008, v. 1, p.85-145.

- LIANG, Y. S. *et al.* Adult worm tegumental damage and egg-granulomas in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* treated *in vivo*. **J. Helminthol.**, v.76, p.327-333, 2002.
- LIU, J. L. *et al.* Ultrastructural localization of Sm28 GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology**, v.113, p.377-391, 1996.
- LOVERDE, P.T.; CARVALHO-QUEIROZ, C.; COOK, R. Vaccination with Antioxidant Enzymes Confers Protective Immunity against Challenge Infection with *Schistosoma mansoni*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.99, p.37-43, 2004.
- LOWRY, O. H. *et al.* Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.**, p.265-275, 1951.
- LUSHCHAK, V.; *et al.* Diethyldithiocarbamate inhibits *in vivo* Cu, Zn-superoxide dismutase and perturbs free radical processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.338, p.1739-1744, 2005.
- MACHADO-SILVA, J. R.; NEVES, R. H., GOMES, D. C. Filogenia, Co-Evolução, Aspectos Morfológicos e Biológicos das Diferentes Fases de Desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P.M. Z.; LENZI, H. L. (Orgs.). **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma Visão Multidisciplinar**. 1. ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008, v. 1, p.148-160.
- MAGALHÃES, L. G. *et al.* *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitol. Res.**, v.104, p.1197-1201, 2009.
- MARTINS Jr., D. F.; BARRETO, M. L. Aspectos macroepidemiológicos da esquistossomose mansônica: análise da relação da irrigação no perfil espacial da endemia no Estado da Bahia. **Cad. Saúde Pública**, v.19, p.383-393, 2003.
- McADAM, A. J.; SHARPE, A. H. Doenças infecciosas. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. (Orgs.). **Patologia – bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005, p.427-428.
- McCORD, J. M.; EDEAS, M. A. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. **Biomed Pharmacother**, v.59, p.139-142, 2005.
- MCKERROW, J. H.; SALTER J. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. **Trends Parasitol.**, v. 18, p.193-195, 2002.
- MEI, H.; LoVERDE, P.T. *Schistosoma mansoni*: The developmental Regulation and Immunolocalization of Antioxidant Enzymes. **Exp. Parasitol.**, v.86, p.69-78, 1997.
- MICHEL, A.; KNOBLOCH, J.; KUNZ, W. P19: a female and tissue specifically expressed gene in *Schistosoma mansoni*, regulated by pairing with the male. **Parasitol.**, v.127, p.519-524, 2003.

- MKOJII, G. M.; SMITH, J. M., PRICHARD, R. K. Anti-oxidant systems in *Schistosoma mansoni*: correlation between susceptibility to oxidant killing and the levels of scavengers of hydrogen peroxide and oxygen free radicals. **Int. J. Parasitol.**, v. 18, p.661–666, 1988.
- MODENA, C. M.; SANTOS-LIMA, W; COELHO, P.M.. Wild and domesticated animals as reservoirs of Schistosomiasis mansoni in Brazil. **Acta Trop.**, v.108, p.242-244, 2008.
- MORAND, S.; MÜLLER-GRAF, C. D. Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (Schistosomatidae) of vertebrates. **Parasitology**, v.120, p.45-56, 2000.
- MORRIS, G. P. Fine structure of the gut epithelium of *Schistosoma mansoni*. **Experientia.**, v.24, p.480-482, 1968.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p.55-63, 1983.
- NARE, B.; SMITH, J.M.; PRICHARD, R. K. *Schistosoma mansoni*: levels of antioxidants and resistance to oxidants increase during development. **Exp. Parasitol.**, v.70, p.389-397, 1990.
- NHIEN, N.T.; *et al.* Effect of Inducers, Incubation Time and Heme Concentration on IC(50) Value Variation in Anti-heme Crystallization Assay. **Trop. Med. Health.**, v.39, n. 4, p.119-126, 2011.
- OLIVEIRA, M. F.; *et al.* Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 111, p.217-221, 2000.
- OLIVEIRA, M. F. *et al.* On the pro-oxidant effects of haemozoin. **FEBS Lett.**, v.512, p.139-144, 2002
- OLIVEIRA, M. F. *et al.* Inhibition of heme aggregation by chloroquine reduces *Schistosoma mansoni* infection. **J. Infect. Dis.**, v.190, p.843-852. 2004.
- OLIVEIRA, M. F. *et al.* Structural and morphological characterization of hemozoin produced by *Schistosoma mansoni* and *Rhodnius prolixus*. **FEBS Lett.**, v.7, p.6010-6016, 2005.
- OMS. PCT- Countries x indicators. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/preventive\\_chemotherapy/sch/db/index.html?units=minimaleregion=allectcountry=allectountries=allectyear=2008](http://www.who.int/neglected_diseases/preventive_chemotherapy/sch/db/index.html?units=minimaleregion=allectcountry=allectountries=allectyear=2008). Acesso em: 10 fev. 2010.
- OMS. **Weekly Epidemiological Record**, n. 9, fev. 2011.
- PAGOLA, S.; *et al.* The structure of malaria pigment b-haematin. **Nature**, v. 404, p. 307-310, 2000.
- PEARCE, E. J.; MACDONALD A. S. The immunobiology of schistosomiasis. **Nat. Rev. Immunol.**, v.7, p.499-511, 2002.



PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. **Int. J. Parasitol.**, v.34, p.527-533, 2004.

PONKA, P. Cell biology of heme. **Am. J. Med. Sci.**, v.318, p.241-256, 1999.

RAHDEN-STARONJ, I.; *et al.* The effects of sodium diethyldithiocarbamate in fibroblasts V79 cells in relation to cytotoxicity, antioxidative enzymes, glutathione, and apoptosis. **Arch. Toxicol.** V.86, p.1841-1850, 2012.

RAMIREZ, B. *et al.* Schistosomes: challenges in compound screening. **Expert Opin. Drug Discov.**, v.2, p.53-61, 2007.

REIMAN, R. M. *et al.* Interlekin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. **Infect. Immun.**, v.74, p.1471-1479, 2006.

REY, L. **PARASITOLOGIA**. 3<sup>o</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

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

RUFFER, M. A. Note on the presence of “bilharzia haematobia” in egyptian mummies of the twentieth dynasty [1250-100 B.C.]. **Br. Med J.**, v.1, p.16, 1910.

RYTER, S. W.; TYRREL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity- Hemeoxygenase has both pro- and antioxidant properties. **Free Radic. Biol. Med.**, v.28, p.289–309, 2000.

SAAVEDRA, R. C.; DANTAS-FILHO, A. M. S.; MIRANDA, M. R. S. Distribuição da Esquistossomose no Estado da Bahia por quinquênio – 1979 a 2007. In: **11<sup>o</sup> Simpósio Internacional sobre Esquistossomose**, 2008, Salvador. Anais do 11<sup>o</sup> Simpósio Internacional sobre Esquistossomose, 2008.

SANTOS, A. B. A.; SOUZA, M. M.; ANDRADE, Z. A. Reinfecções e desenvolvimento da fibrose periportal esquistossomótica no modelo murinho. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 33, p.170-200, 2000.

SAYED, A. A.; WILLIAMS, D. L. Biochemical characterization of 2-cys peroxirredoxin from *Schistosoma mansoni*. **J. Biol. Chem.**, v.279, p.26159-26166, 2004.

SCHMITT, T. H. *et al.* Hemin-Induced Lipid Membrane Disorder and Increased Permeability: a molecular Model for the Mechanism of Cell Lysis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.307, p.96-103, 1993.

SESAB dados não publicados Distribuição da Fauna Planorbídica no Estado da Bahia. Disponível em: <<http://www.saude.ba.gov.br/diverp/arquivos/COAGRAVOS/GT%20Esquistossomose/INDICADORES/Mapas.pdf>>. Acesso em: 20 set. 2011.

SHAOHONG, D. *et al.* Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. **Parasitol. Int.**, v.55, p.63-68, 2006.

SHEEHAN, D.; *et al.* Structure, function and evolution of glutathione transferase: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem. J.**, v.360, p.1-16, 2001.

SIES, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. **Exp. Physiol.**, v.82, p.291-295, 1997.

SKELLY, P. J., WILSON, R.A. Making sense of the schistosome surface. **Adv. Parasitol.**, v.63, p.185-284, 2006.

SKELLY, P.J.; SHOEMAKER, C. B. A molecular genetic study of the variations in metabolic function during schistosome development. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.2, p.281-284, 1995.

SKELLY, P. J; SHOEMAKER, C. B. Induction cues for tegument formation during the transformation of *Schistosoma mansoni* cercariae. **Int. J. Parasitol.**, v.30, p.625-631, 2000.

STANDEN, O. D. The effects of temperature, light and salinity upon the hatching of the ova of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v.45, p.225-41, 1951.

STIEBLER, R. *et al.* On the mechanisms involved in biological heme crystallization. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v.43, p.93-99, 2011.

STURROCK, R. F. The Schistosomes and Their Intermediate Hosts. In: ADEL, M. F. (Org.). **Schistosomiasis**. 1 ed. Imperial College, 2001, p.7-84.

SULLIVAN, D. J. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. **Int. J. Parasitol.** v.32, p.1645-1653, 2002.

VAN DER LINDEN, P. W. G.; DEELDER, A. M. *Schistosoma mansoni*: A Diamidinophenylindole probe for *in vitro* death of Schistosomula. **Exp. Parasitol.**, v.57, p.125-131, 1984.

VERJOVSKI-ALMEIDA, S. *et al.* Transcriptome analysis of the acoelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. **Nat. Genet.**, v. 35, p.148-157, 2003.

VILLIERS, K.A. *et al.* Speciation and structure of ferriprotoporphyrin IX in aqueous solution: spectroscopic and diffusion measurements demonstrate dimerization, but not oxo dimer formation. **J. Biol. Inorg. Chem.** v.12, p.101-117, 2007.

VILLIERS, Katherine A.; EGAN, Timothy J. Recent advances in the discovery of haem-targeting drugs for malaria and schistosomiasis. **Molecules**. V.14, p.2868-2887, 2009.

- WEBSTER, J. P. *et al.* Population genetics of the schistosome intermediate host *Biomphalaria pfeifferi* in the Zimbabwean highveld: implications for co-evolutionary theory. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v.95, p.203-214, 2001.
- WEI, O. Internal organs of a 2100-years-old female corpse. **Lancet**, v.2, p.1198, 1973.
- WILSON, M. S. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol. Cell Biol.**, v. 85, p.148-154, 2007.
- WILSON, R. A.; COULSON P. S. Immune effector mechanisms against schistosomiasis: looking for a chink in the parasite's armour. **Trends Parasitol.**, v.25, p.423-431, 2009.
- XIAO, S. H. *et al.* *Schistosoma japonicum*: effect of artemether on glutathione S-transferase and superoxide dismutase. **Exp. Parasitol.**, v.102, p.38-45, 2002.
- YOSHINO, T. P.; BOYLE, J. P.; HUMPHRIES, J. E. Receptor-ligand interactions and cellular signalling at the host-parasite interface. **Parasitol.**, 2001, v.123, p.143-157, 2003.
- ZERLOTINI, A.; OLIVEIRA, G. The contributions of the Genome Project to the study of schistosomiasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v.105, p.367-369, 2010.
- ZISKIND, B. Urinary schistosomiasis in ancient Egypt. **Nephrol. Ther.**, v.5, p.658-661, 2009.