

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Resistência ao praziquantel por pressão quimioterápica em *Biomphalaria glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni*

por

Flávia Fernanda Búbula Couto

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2010

DISSERTAÇÃO MDIP-CPqRR

F.F.B. COUTO

2010

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Resistência ao praziquantel por pressão quimioterápica em *Biomphalaria glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni*

por

Flávia Fernanda Búbula Couto

**Dissertação apresentada com vistas
à obtenção do Título de Mestre em
Ciências na área de concentração Doenças
Infecciosas e Parasitárias.**

Orientação: Paulo Marcos Zech Coelho

Belo Horizonte

Fevereiro/ 2010

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

C871r

2010 Couto, Flávia Fernanda Búbula.

Resistência ao praziquantel por pressão quimioterápica em *Biomphalaria glabrata* infectada com *Schistosoma mansoni* / Flávia Fernanda Búbula Couto. – Belo Horizonte, 2010.

XIV, 85 f: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f.: 91 – 99

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

1. Esquistossomose mansoni/quimioterapia 2. *Schistosoma mansoni*/parasitologia 3. *Biomphalaria*/efeitos de drogas 4. Praziquantel/uso terapêutico I. Título. II. Coelho, Paulo Marcos Zech (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde**

**Resistência ao praziquantel por pressão quimioterápica em *Biomphalaria glabrata*
infectada com *Schistosoma mansoni***

por

Flávia Fernanda Búbula Couto

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Paulo Marcos Zech Coelho (Presidente)

Profa. Dra. Luzia Helena Carvalho

Profa. Dra. Glória Regina Franco

Suplente: Prof. Dr. Stefan Michael Geiger

Dissertação defendida e aprovada em: 23/02/2010.

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Flávio e Silvania, por todo amor, zelo e dedicação para que este e todos os outros momentos importantes se tornassem realidade. Às minhas irmãs, Marcela e Nayla pela amizade e convivência. Ao Fábio pelo carinho, companheirismo e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus pelas bênçãos diárias em minha vida e por toda força que tem me proporcionado para enfrentar e superar os obstáculos ao longo da minha caminhada.

Ao meu orientador, Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, exemplo de pesquisador, pelos ensinamentos, confiança e pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Esquistossomose.

À Ana Carolina Alves de Mattos, pessoa essencial para a realização deste trabalho. Obrigada pelos ensinamentos, correções, sugestões, boas conversas e, principalmente, pelo incentivo e apoio.

À Neusa Araújo pela grande ajuda nas perfusões, pelo incentivo, conversas e conhecimentos compartilhados durante o trabalho.

Aos bons amigos do Laboratório de Esquistossomose: Ana Karine, Andréa, Áureo, Clarice, Elizandra, Gardênia, Juliano, Jussara, Liliane, Ludmila, Kika, Dr. Naftale, Tati, Rafaella, Suedaly, Vandinha, D. Vera e Watson pelas horas agradáveis de trabalho, estudo, descontração, ajuda e amizade.

À Ana Carolinna Lustosa pela ajuda com as análises estatísticas.

À Delza, Dílcia, Lidiane e Sueleny, pela disposição e por toda ajuda com os caramujos.

Aos funcionários e técnicos do René Rachou que, de alguma forma, contribuíram e ajudaram na realização desse trabalho.

À Biblioteca do CPqRR em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrante do rol de referências desta dissertação, também pela catalogação e normalização da mesma.

Aos colegas e funcionários do Programa de Pós-Graduação.

Aos meus avós, tios e primos, em especial ao Cadinho, pela força, incentivo e principalmente pelo carinho.

Agradeço a todos por contribuírem, de alguma maneira, para minha formação como pessoa e profissional. Obrigada pelo incentivo, apoio e oportunidade de aprendizado.

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS FINANCIADORAS

Agradeço às agências de fomento CNPq, CAPES e ao Centro de Pesquisas René Rachou / FIOCRUZ pelo auxílio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

| | |
|--|-------------|
| LISTA DE FIGURAS..... | X |
| LISTA DE QUADROS..... | XI |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | XII |
| RESUMO..... | XIII |
| ABSTRACT..... | XIV |
| | |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 1.1 Esquistossomose..... | 16 |
| 1.2 Praziquantel (PZQ)..... | 19 |
| 1.2.1 Ação do PZQ na fase intramolusco..... | 21 |
| 1.3 Marcadores fluorescentes..... | 22 |
| 1.4 Resistência ao PZQ..... | 23 |
| | |
| 2 JUSTIFICATIVA..... | 27 |
| | |
| 3 OBJETIVOS..... | 30 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 30 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 30 |
| | |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS..... | 32 |
| 4.1 Avaliação da suscetibilidade do <i>S. mansoni</i> ao PZQ após tratamentos sucessivos na fase intramolusco..... | 32 |
| 4.1.1 Primeira etapa..... | 32 |
| 4.1.1.1 Caramujos e parasitos..... | 32 |
| 4.1.1.2 Infecção e exame dos caramujos..... | 32 |
| 4.1.1.3 Tratamento dos caramujos com PZQ..... | 32 |
| 4.1.2 Segunda etapa..... | 33 |
| 4.1.2.1 Animais e parasitos..... | 33 |
| 4.1.2.2 Infecção dos camundongos..... | 33 |
| 4.1.2.3 Tratamento experimental em camundongos..... | 34 |
| 4.1.2.4 Recuperação de vermes..... | 34 |
| 4.1.2.5 Análise estatística..... | 35 |

| | |
|---|-----------|
| 4.2 Cultivo de vermes..... | 35 |
| 4.2.1 Recuperação e cultivo de vermes..... | 35 |
| 4.3 Avaliação da atividade excretora e do dano causado no tegumento por sondas fluorescentes..... | 36 |
| 4.3.1 Avaliação da atividade excretora após adição do PZQ <i>in vitro</i> | 36 |
| 4.3.2 Avaliação de dano no tegumento..... | 37 |
| 4.3.2.1 Avaliação de dano no tegumento após adição do PZQ <i>in vitro</i> | 37 |
| 4.3.2.2 Avaliação de dano no tegumento após tratamento <i>in vivo</i> com PZQ..... | 37 |
| 4.4 Imagens fotográficas..... | 38 |
| 5 RESULTADOS: ARTIGOS..... | 40 |
| 5.1 Artigo 1..... | 40 |
| 5.2 Artigo 2..... | 64 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 85 |
| 7 ANEXO..... | 89 |
| 7.1 Aceite da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FIOCRUZ)..... | 89 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 91 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1 – Ciclo evolutivo do <i>S. mansoni</i> | 17 |
| Figura 2 – Estrutura química do PZQ..... | 20 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---------------------------------------|----|
| Quadro 1 – Esquemas terapêuticos..... | 34 |
|---------------------------------------|----|

LISTA DE ABREVIATURAS

ABC – cassete de ligação a ATP

ED₅₀ – dose efetiva para matar 50% dos vermes

I – caramujos infectados e não tratados

IT – caramujos infectados e tratados com PZQ

LE – cepa de *Schistosoma mansoni* linhagem susceptível ao PZQ mantida no Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ

LE-PZQ – cepa de *Schistosoma mansoni* previamente submetida a 3 tratamentos com praziquantel na fase intramolusco

MRP – proteínas associadas à resistência a multi drogas

OXA – oxaminiquina

Pgp – P-glicoproteína

PZQ – praziquantel

SFB – soro fetal bovino

WHO – *World Health Organization*

RESUMO

Diversos autores já relataram a existência de cepas de *Schistosoma mansoni* resistentes ao praziquantel (PZQ). No entanto, um dos grandes problemas envolvidos no estudo destas cepas está relacionado com as dificuldades operacionais do método clássico utilizado para seleção em condições laboratoriais. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se sucessivos tratamentos com PZQ em *Biomphalaria glabrata* infectadas com o parasito poderiam selecionar um isolado resistente de maneira rápida, simples e econômica. Para avaliar o grau desta resistência, comparou-se a cepa padrão (LE) e o isolado selecionado após sucessivos tratamentos na fase intramolusco (LE-PZQ) utilizando camundongos infectados. Para avaliação da suscetibilidade do *S. mansoni* ao PZQ após tratamentos na fase intramolusco, caramujos da espécie *B. glabrata* foram infectados com *S. mansoni* (cepa LE) e tratados com PZQ. No período em que os caramujos voltaram a eliminar cercárias, camundongos foram infectados e tratados com diferentes dosagens de PZQ. Os cálculos da ED₅₀ da cepa LE e do isolado LE-PZQ foram realizados. Para o cultivo de vermes adultos, camundongos infectados com cercárias LE ou LE-PZQ, após 45 dias de infecção, foram tratados com PZQ e após 2 horas, perfundidos. Os vermes recuperados foram cultivados por 7 dias. Para comparar a atividade excretora, vermes LE ou LE-PZQ foram colocados em contato com a sonda resorufim e, posteriormente, exposto ao PZQ. Para avaliação do dano causado ao tegumento, os vermes LE e LE-PZQ foram expostos diretamente ao fármaco ou recuperados após duas horas do tratamento de animais infectados com LE ou LE-PZQ e, posteriormente, incubados com a sonda Hoechst 33258. Os valores das ED₅₀ obtidos foram de 68mg/Kg e 362mg/kg para a cepa LE e isolado LE-PZQ ($p < 0,05$), respectivamente. Quanto ao cultivo dos vermes adultos após tratamento com dos camundongos com PZQ, verificou-se que os parasitos do isolado LE-PZQ apresentaram-se menos contraídos do que a cepa LE. Em relação aos ovos, observou-se ovos de todos os estádios e mortos no isolado LE-PZQ (>300) enquanto na cepa LE, os ovos estavam em quantidade bem inferiores e, praticamente todos, mortos (± 30 ovos). Nos experimentos com a resorufim, os vermes adultos da cepa LE não apresentaram marcação pela sonda após a exposição ao PZQ *in vitro*, enquanto os do isolado LE-PZQ permaneceram com o sistema excretor ativo e, portanto marcado. Nos experimentos com a Hoechst 33258, parasitos do isolado LE-PZQ apresentaram lesões menos intensas em seus tegumentos do que os da cepa LE tanto após exposição ao PZQ *in vivo* quanto *in vitro*. Desta forma, foi demonstrado que a pressão quimioterápica com PZQ utilizando *B. glabrata* infectadas com *S. mansoni* é um método eficiente para seleção de isolados resistentes a este fármaco.

ABSTRACT

Various authors have already reported about *Schistosoma mansoni* isolates resistant to praziquantel (PZQ). Nevertheless, one of the major problems involved in the study of those isolates is related with operational drawbacks of the classical method used for selection under laboratory conditions. Thus, the purpose of this study was to evaluate successive treatments with PZQ administered in infected *Biomphalaria glabrata*, aiming at selecting a resistant isolate in a rapid, simple and unexpensive manner. In order to evaluate the level of resistance, the standard isolate (LE) was compared to that one obtained after successive treatments at the intramolluscan phase (LE-PZQ), using infected mice. The susceptibility of *S. mansoni* to PZQ, after treatments at the intramolluscan phase, was evaluated using *B. glabrata* snails infected with *S. mansoni* (LE strain) and treated with PZQ. When the snails were again shedding cercariae, mice were infected and treated with different doses of PZQ. ED₅₀ for the LE and LE-PZQ isolates were calculated. In order to obtain cultured adult worms, mice infected with LE or LE-PZQ cercariae, after 45 days post-infection were treated with PZQ and perfused after two hours. The recovered worms were cultured for 7 days. With the aim to compare the excretory activity, LE or LE-PZQ worms were put in contact with the probe resorufin, and afterwards exposed to PZQ. To evaluate the tegumental damages, the LE and LE-PZQ worms were directly exposed to the drug or recovered after two hours post-treatment of the animals infected with LE or LE-PZQ, and after that incubated with the probe Hoechst 33258. The ED₅₀ values obtained were 68mg/Kg and 362mg/Kg for the LE and LE-PZQ isolates, respectively (p<0,05). In relation to the culture of adult worms after treatment of mice with PZQ, it was verified that the parasites of the LE-PZQ isolate were found to be less contracted than those of the LE isolate. All stages of eggs, including the dead ones, could be seen in the LE-PZQ (>300) isolate, whereas in the LE isolate the eggs were in lower numbers and practically all dead (\pm 30 eggs). In the experiments with the probe resorufin, the adult worms of the LE isolate did not present labeling by the probe after exposure to PZQ *in vitro*, whereas those ones of the LE-PZQ isolate remained with the excretory system active and therefore labeled. In the experiments with the probe Hoechst 33258, the parasites of the LE-PZQ isolate showed less intense tegumental damages than the ones of the LE isolate, after exposure to PZQ *in vivo* and *in vitro*. In this way, it was demonstrated that the chemotherapeutic pressure with PZQ using *B. glabrata* infected with *S. mansoni* is an efficient method for selection of isolates resistant to the drug.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias representam um grave problema de saúde pública em muitas partes do mundo, particularmente em muitos países em desenvolvimento, refletindo a situação econômica e social desses países.

1.1 Esquistossomose

A esquistossomose continua sendo uma das infecções parasitárias mais prevalentes no mundo (Engels *et al.*, 2002). É uma doença parasitária que infecta mais de 207 milhões de pessoas em 76 países, com mais de 779 milhões de pessoas sob o risco de infecção ao redor do mundo (Steinman *et al.*, 2006). Além disso, aproximadamente 280 mil mortes por ano são atribuídas às esquistossomoses (Van der Wer *et al.*, 2003). A doença é crônica e insidiosa, sendo pouco comum seu diagnóstico em estágios iniciais; sua evolução pode levar ao desenvolvimento de formas clínicas incapacitantes para homens e mulheres em suas idades mais produtivas (Engels *et al.*, 2002).

As esquistossomoses são causadas por trematódeos digenéticos, pertencentes ao gênero *Schistosoma*. Das cinco espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, as de maior relevância são: *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), *S. haematobium* (Bilharz, 1852) e *S. japonicum* (Katsurada, 1904) (Paraense, 1975), causadores, respectivamente, da esquistossomose mansoni, esquistossomose hematóbica e esquistossomose japônica.

No Brasil, a esquistossomose é causada pelo *S. mansoni* e consiste em um grave problema de saúde pública, abrangendo 19 estados. Nas regiões sudeste e nordeste, existem áreas de intensa transmissão, desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, enquanto nas regiões norte e sul, existem apenas áreas de média extensão e focos isolados (Coura & Amaral, 2004; Teles, 2005). Segundo Katz & Peixoto (2000), mais de 8 milhões de pessoas estão infectadas, enquanto outras 30 milhões estão expostas ao risco de infecção. Essa endemia está associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico, o que gera a necessidade de utilização de águas naturais contaminadas para o exercício da agricultura, trabalho doméstico e/ou lazer.

Schistosoma mansoni possui um ciclo evolutivo complexo que envolve uma reprodução assexuada ocorrida no molusco (hospedeiro intermediário) e uma reprodução sexuada ocorrida no hospedeiro vertebrado.

O ciclo de vida do *S. mansoni* (Figura 1) tem início quando os ovos são eliminados nas fezes do hospedeiro vertebrado (geralmente o homem) no meio aquático. Os ovos eliminados eclodem liberando os miracídeos, que penetram no hospedeiro intermediário específico, os

caramujos, por movimentos rotatórios e ação lítica. Após a penetração, ocorre a perda do epitélio ciliar e a degeneração do terebratorium (extremidade anterior do parasito, onde se encontram as terminações das glândulas adesivas e de penetração). Após uma série de transformações morfológicas, a larva passa a ser chamada esporocisto primário e, na 2ª semana após a penetração, esporocisto secundário. Ocorre, então, uma migração entre os tecidos dos esporocistos, até alcançarem a glândula digestiva ou hepatopâncreas. Esses esporocistos secundários sofrem modificações anatômicas, dando início a proliferação das células germinativas e origem às cercárias de cauda bifurcada, após 25 a 30 dias. Milhares de cercárias são produzidas por cada esporocisto que as liberam de forma intermitente nas horas mais claras do dia, já que a liberação das cercárias pelos caramujos é induzida pela luz e temperaturas mais altas. As cercárias eliminadas pelo molusco nadam ativamente e, ao encontrar o hospedeiro definitivo, penetram na pele ou mucosas e perdem a cauda, transformando-se em esquistossômulos. Estes migram para os vasos sanguíneos, dirigindo-se aos pulmões e destes, para o fígado (onde ocorre a maturação dos vermes). Após o acasalamento, os vermes adultos alcançam as veias mesentéricas inferiores e realizam a postura dos ovos. Parte desses ovos ganha a circulação e depositam-se no fígado, gerando os granulomas, enquanto outros ovos podem depositar-se nas paredes intestinais, e parte destes alcançar a luz intestinal, sendo eliminados pelas fezes, reiniciando o ciclo.

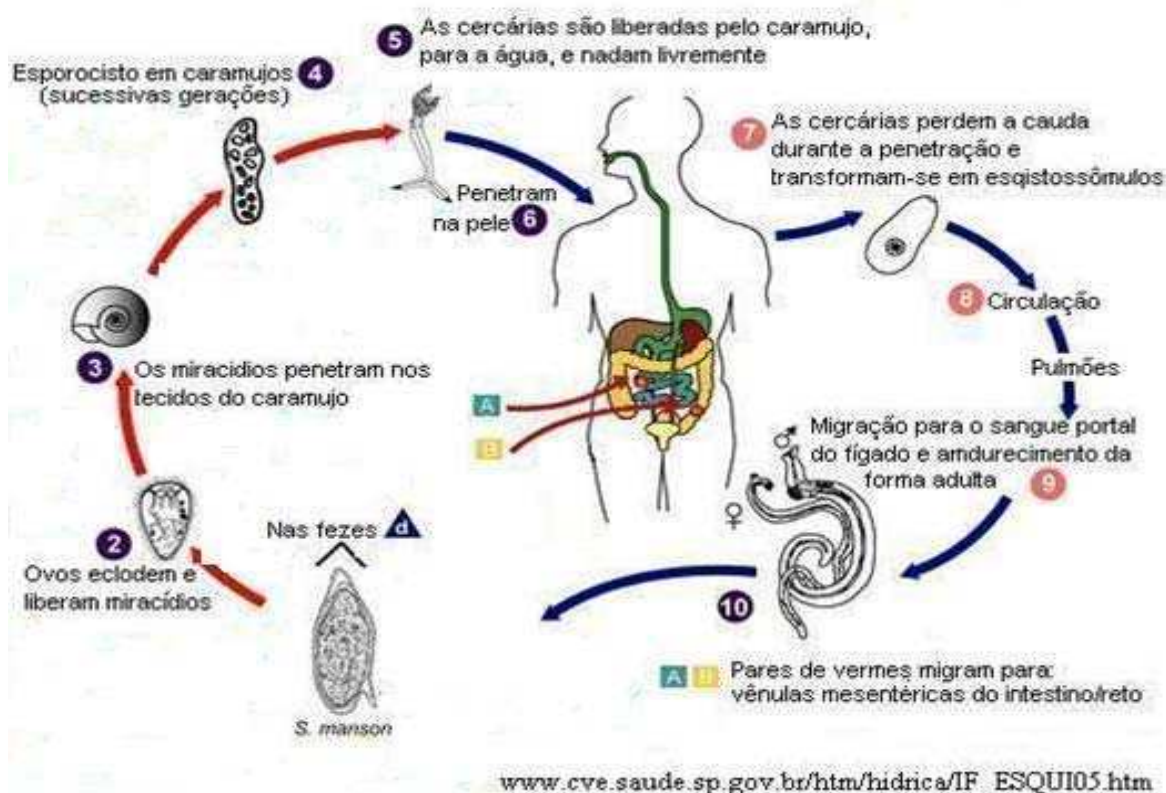


Figura 1 – Ciclo evolutivo do *S. mansoni*

Os hospedeiros invertebrados do *S. mansoni* são moluscos do gênero *Biomphalaria*, pertencentes à subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora, família Planorbidae. No Brasil, existem dez espécies e uma sub-espécie pertencentes a esse gênero, mas somente três já foram encontradas eliminando cercárias em condições naturais. São elas: *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818), *B. tenagophila* (Orbigny, 1835), *B. straminea* (Dunker, 1848) (Paraense, 1975). Caramujos da espécie *B. glabrata* possuem uma ampla distribuição geográfica e quase sempre associada à transmissão da esquistossomose. De fato, *B. glabrata* já foi notificada em 16 estados brasileiros, além de no Distrito Federal. Caramujos da espécie *B. straminea* apresentam maior importância epidemiológica na Região Nordeste. A espécie *B. tenagophila* é encontrada numa faixa litorânea, de forma quase contínua, a partir do sul do Estado da Bahia até o Estado do Rio Grande do Sul (Brasil, 2008).

Até a década de 70, o combate à esquistossomose tinha como objetivo principal o controle da transmissão, tendo como principal medida a redução das populações dos moluscos, hospedeiros intermediários. De acordo com o Ministério da Saúde (Brasil, 2008), a partir dos anos 80, depois do advento de fármacos mais eficazes, seguros e baratos, o principal objetivo passou a ser o controle da morbidade, com ênfase no tratamento quimioterápico. Segundo a WHO (1993), a quimioterapia é a principal alternativa para reduzir a morbidade da doença em áreas endêmicas, bem como tratar casos isolados da doença. Contudo, a estratégia atual é conjugar o controle quimioterápico com medidas preventivas, como a educação em saúde e o saneamento, além do controle dos hospedeiros intermediários, por meio do uso de moluscidas, controle biológico e alterações no ambiente aquático (Brasil, 2008). Conforme Coura & Amaral (2004), o controle da doença no Brasil é dificultado por algumas razões, a saber: disseminação dos hospedeiros intermediários; altos custos para a implementação de condições sanitárias ideais e de suprimento de água tratada; dificuldades para proteção individual. Assim, verifica-se a continuidade de um intenso contato com águas naturais, propiciando reinfecção. O longo tempo necessário para a educação sanitária funcionar adequadamente e para atingir a adesão das comunidades de maneira efetiva aos programas de controle é outro problema complexo.

A maioria das pessoas infectadas com esquistossomose permanece assintomática. A sintomatologia clínica corresponde ao estágio de desenvolvimento do parasito no hospedeiro e varia dependendo da localização e intensidade do parasitismo, da capacidade de resposta do indivíduo e do tratamento instituído. Desse modo, a esquistossomose pode se apresentar sob duas formas: aguda ou crônica.

Na fase aguda, com início no momento da infecção (dermatite) e considerada como tal até os 120 dias após a infecção, o paciente pode apresentar febre, dor de cabeça, calafrios,

suores, fraqueza, falta de apetite, dor muscular, tosse, diarreia e uma imunopatologia mais exacerbada (granulomas maiores do tipo necrótico exudativo). A fase crônica, com início a partir de 120 dias após a infecção, com a reação imunoinflamatória imunomoduladora, pode se apresentar de três formas: a digestiva intestinal, a hepatointestinal, ambas mais brandas, e a hepatoesplênica, mais grave, podendo ser compensada ou descompensada. De acordo com Warren *et al.* (1972), o evento patogênico mais importante na esquistossomose é a formação do granuloma, provocado pelo ovo do parasito. Desse modo, algumas manifestações ectópicas da doença, como, por exemplo, a neurológica e a vasculopulmonar, são causadas pela presença de granulomas, devido às alterações hemodinâmicas, principalmente, na medula e nos vasos pulmonares, respectivamente.

Os dois principais medicamentos utilizados no tratamento da esquistossomose são a oxamniquina (OXA) (Mansil – Pfizer S.A) e o praziquantel (PZQ) (Farmanguinhos - Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ).

A OXA é uma tetrahydroquinolina semi-sintética e tornou-se disponível para o tratamento da esquistossomose nos anos 70, sendo, em passado recente, muito utilizada no tratamento em massa, com aproximadamente 13 milhões de pessoas tratadas na América do Sul e África (Fenwick *et al.*, 2003). Atualmente, a produção da OXA está sendo reduzida no Brasil e esse fármaco vem sendo substituído pelo PZQ para o tratamento da esquistossomose, tanto em campanhas de saúde pública como na clínica, tendo em vista sua boa eficiência e baixo custo na produção do medicamento pela FIOCRUZ.

1.2 Praziquantel (PZQ)

O PZQ (Figura 2) é um derivado sintético da pirazina isoquinolina e é, atualmente, o medicamento de escolha, segundo a OMS, para o tratamento em larga escala da esquistossomose, sendo efetivo contra as cinco espécies de *Schistosoma* (Doenhoff *et al.*, 2002). Sua preparação comercial é uma mistura racêmica composta de partes iguais de *levo R* (-) e *dextro S* (+) isômeros. Porém, apenas o enantiômero (-) possui atividade esquistossomicida (Xiao & Catto, 1989; Wu *et al.*, 1991).

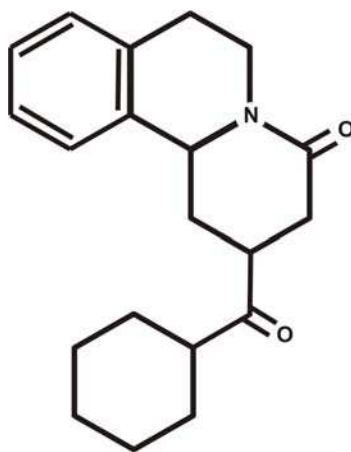


Figura 2 – Estrutura química do PZQ

A dose recomendada para o tratamento da esquistossomose mansoni e hematobica é de 40-60mg/Kg, sendo utilizadas doses mais elevadas nos casos de esquistossomose japônica e em alguns países africanos (WHO, 2002). Em geral, o PZQ apresenta baixa toxicidade e sua eliminação ocorre através da urina e fezes após 24 horas (Cioli & Pica-Mattoccia, 2003). É efetivo em pacientes de todas as idades e em diferentes formas clínicas da doença, inclusive na forma hepatoesplênica descompensada (Bassily *et al.*, 1985) e atua mais eficientemente contra os vermes fêmeas.

Apesar dos inúmeros trabalhos realizados na tentativa de esclarecer o modo de ação do PZQ, existem muitas perguntas a elucidar (Day *et al.*, 1992; Redman *et al.*, 1996; Cioli & Pica-Mattoccia, 2003). No entanto, alguns efeitos desse fármaco sobre o parasito já estão bem esclarecidos, como contração muscular, dano tegumentar e alterações metabólicas (Pax *et al.*, 1978; Becker *et al.*, 1980; Fetterer *et al.*, 1980; Mehlhorn *et al.*, 1981; Lima *et al.*, 1994; Ribeiro *et al.*, 1998; Oliveira *et al.*, 2006).

A contração muscular é um dos primeiros efeitos observados no verme exposto ao fármaco *in vivo* ou *in vitro* (Cioli & Pica-Mattoccia, 2003). Em decorrência da contração, os vermes perdem a capacidade de fixação, devido ao relaxamento da ventosa ventral (acetábulo), e são arrastados para o fígado, onde ocorrem reações inflamatórias, e, em conjunto com outras lesões, culminará com a eliminação dos parasitos.

As alterações causadas no tegumento também são observadas logo após o contato com o fármaco e são devidas à vacuolização na base do tegumento, seguidas de bolhas na superfície (Pax *et al.*, 1978). Além disso, o PZQ gera alteração na fluidez da membrana do verme e desestabilização do tegumento (Lima *et al.*, 1994). Estas alterações causam a morte direta do parasito ou ainda podem levar à exposição de antígenos, que seriam rapidamente reconhecidos pelo sistema imune do hospedeiro e este, em conjunto com o fármaco, eliminaria o parasito (Harnett & Kusel, 1986; Doenhoff *et al.*, 1987; Modha *et al.*, 1990).

Acredita-se que a maioria desses mecanismos de ação do PZQ sejam processos dependentes de Ca^{++} (Cioli *et al.*, 1995), uma vez que foi demonstrado, em experimentos *in vitro*, realizados em meio de cultura livre de Ca^{++} , o bloqueio dessas respostas (Pax *et al.*, 1978; Wolde Mussie *et al.*, 1982; Xiao *et al.*, 1984). Sugere-se, ainda, que o PZQ atue inibindo canais de cálcio (Greenberg, 2005), uma vez que, com a interferência na função desses canais do parasita, foi possível obter um significativo nível de inibição da atividade esquistossomicida do PZQ (Pica-Mattoccia *et al.*, 2007).

Em experimentos *in vitro*, após a exposição ao PZQ, foi possível observar uma depleção do conteúdo de glutatona dos parasitas (Ribeiro *et al.*, 1998). A glutatona é um tripeptídeo fundamental para a sobrevivência das células, como a síntese do DNA e proteínas, atividade enzimática, transporte e proteção celular (Meister & Anderson, 1983).

Oliveira *et al.* (2006) demonstraram que o PZQ é, também, capaz de inibir a atividade excretora de vermes adultos de *S. mansoni* e esta pode ser recuperada, dependendo da concentração do fármaco, após retirada do medicamento.

1.2.1 Ação do PZQ na fase intramolusco

Alguns estudos já demonstraram a ação de diferentes medicamentos que atuam em vermes adultos na fase intramolusco do parasito. O cloranfenicol (Warren & Weisberg, 1966), hycanthone (Warren, 1967) e a OXA (Coelho *et al.*, 1988) também foram capazes de suprimir a eliminação de cercárias após exposição a esses fármacos.

A ação do PZQ frente à miracídios e esporocistos também já foi descrita (Andrews, 1978; Coles, 1979; Touassem & Combes, 1986; Yi & Combes, 1987; Coelho *et al.*, 1988; Riley & Chappell, 1990; Liang *et al.*, 2001; Liang *et al.*, 2003; Mattos *et al.*, 2006). Nestes estudos, foi possível verificar que tanto os miracídios quanto os esporocistos são afetados pelo PZQ. De acordo com Coles (1973), enzimas presentes em esporocistos migram de maneira semelhante às de vermes adultos em eletroforese. Esses dados apontam para uma similaridade entre as vias metabólicas destas duas diferentes fases do ciclo de vida do *Schistosoma* (Coelho *et al.*, 1988).

Já foi descrito que os miracídios perdem a motilidade e o poder infectante após o contato com o PZQ (Coles, 1979). Touassem & Combes (1986) demonstraram uma interrupção imediata e momentânea na eliminação de cercárias após submissão ao PZQ, em que foi possível verificar a eliminação total das cercárias e a não produção de cercárias pelos esporocistos secundários, durante o tratamento. Riley & Chappell (1990) também demonstraram uma redução na eliminação de cercárias após tratamento de caramujos com PZQ, sugerindo uma rápida ação do fármaco. Yi & Combes (1987) submeteram moluscos

Oncomelania hupensis, infectados com 10 miracídios do parasito, ao tratamento com PZQ diluído em água, em diferentes concentrações, por 24 horas. Com os resultados obtidos, esses autores e, em seguida, Coelho *et al.* (1988) sugeriram que o tratamento de caramujos infectados com fármacos esquistossomicidas possa ser um método alternativo e barato para triagem de fármacos, e ainda ser uma técnica útil na comparação da sensibilidade de cepas de diferentes áreas geográficas. Nos estudos de Liang *et al.* (2001; 2003), observou-se que os miracídios, expostos *in vitro* ao PZQ, apresentaram uma rápida e marcante alteração em sua morfologia. Mattos *et al.* (2007) também demonstraram que o PZQ age no estágio intramolusco do *S. mansoni*. Esse fármaco, incorporada à ração e fornecida a *B. glabrata*, leva à interrupção imediata da eliminação de cercárias, que permanece por aproximadamente 15 dias. Após esse período, os caramujos voltam a eliminar cercárias em números bem menores do que os encontrados antes do tratamento.

1.3 Marcadores fluorescentes

Uma ferramenta que vem sendo utilizada para avaliar a ação do PZQ sobre as diferentes fases do ciclo de vida do *S. mansoni* são as sondas fluorescentes. O fenômeno da fluorescência pode ser descrito sucintamente como um tipo de emissão de luz (luminescência) em que um corpo (sonda fluorescente ou fluoróforo) absorve luz e logo depois a emite. Os fluoróforos são projetados para localizar uma área específica da amostra a ser observada ou para responder a um estímulo específico. Assim, esses fluoróforos permitem a visualização de estruturas, compostos ou processos em curso em um determinado material em estudo (Oliveira, 2005). Nos experimentos em que foi possível observar que o PZQ causa depleção no nível de glutatona, realizados por Ribeiro *et al.* (1998), também foram utilizadas técnicas de fluorescência. Al-Adhami *et al.* (2003; 2005) demonstraram a presença de compartimentos ácidos em miracídios, esquistossômulos e vermes adultos, utilizando um marcador fluorescente específico para corar lisossomos. Além disso, Carneiro-Santos *et al.* (2001) descreveram a ausência desses compartimentos em cercárias e, ainda, verificaram a ação do PZQ sobre essas vesículas ácidas em esquistossômulos transformados. Mattos *et al.* (2006) demonstraram, pela primeira vez, a presença de vesículas ácidas em esporocistos, utilizando marcadores fluorescentes. A presença de diversas lectinas em esporocistos transformados *in vitro* ou presentes em cortes histológicos de tecidos de caramujos também já foi descrita, utilizando-se marcadores fluorescentes específicos (Yoshino *et al.*, 1977; Zelck & Becker, 1990; Uchikawa & Locker, 1991; Johnston & Yoshino, 1996).

Sato *et al.* (2002; 2004) utilizaram uma sonda fluorescente, a resorufim, para avaliar a atividade excretora do *S. mansoni*. A resorufim é um sal sódico (7-hidroxi 3-fenoxazina) de

natureza fluorescente e é um substrato para a P-glicoproteína (Pgp). Esta sonda difunde-se passivamente através do tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* e é excretada por meio de uma suposta Pgp expressa no epitélio excretor. A Pgp é uma proteína que possui um importante papel na absorção, eliminação e distribuição de muitos xenobióticos, incluindo uma variedade de fármacos (Schinkel & Jonker, 2003). Em trabalho realizado por Oliveira *et al.* (2006), utilizando a resorufim, demonstrou-se que o PZQ é capaz de inibir a atividade excretora de vermes adultos da cepa LE de *S. mansoni* e que esta atividade pode ser recuperada quando o verme é retirado do contato com o fármaco.

Uma ferramenta sensível para identificação de lesões no tegumento do *S. mansoni* é a sonda fluorescente Hoechst 33258 (Oliveira *et al.*, 2006). A Hoechst 33258 (bis benzamida) é uma sonda hidrofílica e que se torna fluorescente somente quando se liga ao DNA das células. Por ser hidrofílica, só consegue se difundir para o interior das células quando há presença de lesões, atuando como um indicador de integridade de membrana, e já foi utilizada em diversos estudos, não só em vermes adultos (Lima *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2006), mas em esquistossômulo (Kusel *et al.*, 2007), esporocisto (Mattos *et al.*, 2006) e cercárias (Thornhill *et al.*, 2009). Outras sondas também já foram utilizadas para a visualização de danos na membrana de vermes adultos, contudo a sonda Hoechst 33258 foi a que se mostrou mais sensível na marcação de regiões onde há dano (Oliveira, 2005).

1.4 Resistência ao PZQ

Em muitas infecções por helmintos, o uso da quimioterapia é dificultado pela ocorrência de resistência ou tolerância a certos fármacos. Conforme Fallon *et al.* (1996), a tolerância é uma não suscetibilidade inata do parasita ao fármaco, antes mesmo de ter sido exposto a ela. A tolerância a esquistossomicidas pode se manifestar na diferença de suscetibilidade na idade e no sexo do parasita. Estudos em laboratório já demonstraram que a atividade do PZQ e outros fármacos esquistossomicidas são estágio-dependentes. Vermes imaturos (3 a 5 semanas) são menos suscetíveis ao PZQ do que vermes adultos (Gonnert & Andrews, 1977; Sabah *et al.*, 1986; Xiao *et al.*, 1986; Pica-Mattoccia & Cioli, 2004).

Kinoti & Coles (1997) sugeriram que uma população de *Schistosoma* é resistente quando há uma redução significativa na sua resposta a agentes esquistossomicidas em relação a populações suscetíveis. Existem também longas discussões com relação à falha no tratamento com PZQ, principalmente em áreas endêmicas, se esta se deve a altas taxas de transmissão e re-infecção ou resistência/tolerância do parasita ao fármaco (Gryseels *et al.*, 2001; Doenhoff *et al.*, 2002).

Em função da eficiência e segurança dos medicamentos existentes, foi possível o emprego destes em larga escala em áreas endêmicas, bem como em tratamentos repetidos. Porém, o uso da quimioterapia em massa e de tratamentos repetitivos, como principal método de controle da esquistossomose em áreas endêmicas, pode gerar o surgimento de cepas resistentes, através do mecanismo de pressão seletiva (Coelho *et al.*, 1997). O PZQ é atualmente o medicamento utilizado para o tratamento da esquistossomose em populações, e a existência de cepas de *Schistosoma* resistentes ao PZQ pode ser considerada potencialmente um problema para o controle dessa doença, uma vez que, de acordo com El-Ansary *et al.* (2006), os métodos de controle da esquistossomose têm sido centralizados no uso da quimioterapia.

Várias medidas têm sido sugeridas para se tentar reduzir o impacto da resistência a fármacos esquistossomicidas: educação sanitária para evitar a reinfecção após o tratamento; aumento da vigilância pelos órgãos oficiais de saúde pública, para monitorar o aparecimento de resistência; desenvolvimento de técnicas simples e factíveis para a detecção de cepas resistentes no campo; desenvolvimento de novos fármacos esquistossomicidas; associação de fármacos (Bennett *et al.*, 1997).

A resistência a esquistossomicidas foi relatada, primeiramente, com o hycanthone e a OXA no Brasil (Katz *et al.*, 1973; Campos *et al.*, 1976; Araújo *et al.*, 1996). Estudos posteriores no Kenya e no Brasil, onde o tratamento em massa é realizado, demonstraram a resistência de vermes após sucessivos tratamentos quimioterápicos (Coles & Bruce, 1987). O primeiro relato de resistência ao PZQ foi registrado por Fallon & Doenhoff (1994), em laboratório. A partir deste trabalho, alguns estudos já demonstraram a existência de cepas de *S. mansoni* resistentes ou tolerantes ao PZQ, tanto no campo quanto em laboratório (Fallon *et al.*, 1995; Stelma *et al.*, 1995; Araújo *et al.*, 1996, Ismail *et al.*, 1996; Ismail *et al.*, 1999; Bonesso-Sabadini & Dias, 2002).

Sugere-se, também, que baixos índices de cura em algumas regiões possam manifestar uma falsa resistência/tolerância, sendo as altas taxas de infecção e reinfecção, além da presença de vermes imaturos, em grandes proporções, os principais responsáveis pela baixa eficácia do PZQ durante o tratamento (Doenhoff *et al.*, 2002).

Vários parâmetros têm sido utilizados para se tentar definir a existência de cepas resistentes. Fallon *et al.* (1996) propuseram considerar que isolados resistentes devem possuir ED₅₀, pelo menos, cinco vezes maior do que as cepas sensíveis ao fármaco e são considerados com suscetibilidade reduzida quando a ED₅₀ for três vezes maior. No entanto, conforme Bennet *et al.* (1997), a dose efetiva para matar 50% dos vermes adultos de isolados resistentes é de três a cinco vezes maior que para isolados sensíveis. Cioli *et al.* (2004) avaliaram os

valores de ED₅₀ (dose efetiva para matar 50% dos vermes) considerados para isolados sensíveis e resistentes ao PZQ e observaram que vermes resistentes demonstraram apresentar ED₅₀ três vezes maior que os isolados controle. Além disso, a taxa de eclosão de miracídios, o tempo necessário para que o PZQ altere a morfologia do miracídio, bem como a taxa de cercárias que perdem a cauda em contato com PZQ, durante um determinado tempo, já foram sugeridos como parâmetros para se definir a presença ou não de resistência (Liang *et al.*, 2000; 2001). Contudo, devido a diferenças na suscetibilidade ao PZQ entre as espécies e linhagens de *Schistosoma*, esses ensaios devem ser melhor avaliados, comparando-se as respostas das várias espécies e cepas (Liang *et al.*, 2001).

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

Diante da carência de encontrar um método rápido e confiável para selecionar linhagens de *Schistosoma* resistentes ao PZQ em laboratório, no presente trabalho, foi idealizada uma hipótese de selecionar *S. mansoni* resistentes a partir de sucessivos tratamentos, utilizando como modelo experimental *B. glabrata* infectada, considerando que a pressão quimioterápica seria exercida sobre milhares de formas evolutivas, as cercárias, (pressão sobre um número muitíssimo maior de organismos do que no modelo com camundongo, em vermes adultos), desta maneira, abreviando o processo seletivo.

Um aspecto crítico na evolução de resistência a fármacos entre helmintos é que os métodos usados para detectar o desenvolvimento de resistência não existem ou não são sensíveis (Bennett *et al.*, 1997). Além disso, estes isolados artificialmente selecionados são fundamentais para elaborar métodos de detecção precoce de resistência, bem como novas estratégias terapêuticas (Fallon & Doenhoff, 1994). Por outro lado, na ausência de conhecimento sobre os mecanismos de ação de PZQ, as hipóteses sobre os mecanismos de resistência permanecem especulativos (Doenhoff *et al.*, 2008). Coles (1989) sugeriu que a existência de parasitos resistentes ao PZQ pode ajudar a elucidar os mecanismos moleculares de ação do fármaco. Desta forma, a possibilidade de seleção de isolados resistentes, em laboratório, utilizando *S. mansoni* na fase intramolusco, seria de grande valia, uma vez que seria um processo mais fácil, simples e econômico do que o método clássico que utiliza hospedeiros vertebrados em laboratório.

O sistema excretor do *Schistosoma* tem recebido, nos últimos anos, atenção especial, devido ao seu importante papel na interação parasito-hospedeiro. Bosch *et al.* (1994) descreveram a presença da SMDR2, um homólogo para a Pgp, no *S. mansoni*. Estas Pgp, assim como as proteínas associadas à resistência multi drogas (MRP), são transportadoras ABC (*ATP-binding cassette*) e estão associadas a fenótipo de resistência a fármacos, assim como são frequentemente expressas em células com resistência tumoral e com função de reduzir a citotoxicidade de medicamentos no citoplasma dessas células (Kusel *et al.*, 2006). Proteínas transportadoras ABC, em particular proteínas MRP, podem estar envolvidas na resistência às fármacos em helmintos e outros organismos (Lage, 2003; James *et al.*, 2009). Em estudo realizado recentemente, Messerli *et al.* (2009) demonstraram que isolados menos suscetíveis ao PZQ apresentam níveis mais elevados de RNA para SMDR2 do que em isolados sensíveis ao fármaco. Contudo, mais trabalhos avaliando o papel de proteínas transportadoras ABC no *Schistosoma* são importantes para entender a expressão e a atividade

dessas proteínas na eliminação de fármacos e na resistência para possibilitar a avaliação da eficácia dos tratamentos (James *et al.*, 2009).

Outra opção para diferenciar cepas sensíveis de cepas resistentes ao PZQ seria por meio da observação de danos no tegumento. William *et al.* (2001) observaram uma diminuição na extensão do dano causado pelo PZQ ao tegumento dos vermes resistentes, quando comparado ao de vermes sensíveis. Além disso, Oliveira *et al.* (2006) mostraram que o PZQ é capaz de gerar danos no tegumento de vermes adultos sensíveis, utilizando a sonda Hoechst 33258. Diante disso, a avaliação da presença de dano no tegumento em vermes adultos, bem como a atividade excretora dos parasitos, após exposição ao PZQ, utilizando marcadores fluorescentes específicos, pode ser uma alternativa para identificação de cepas de *S. mansoni* resistentes ao PZQ, uma vez que Ismail *et al.* (1996) e William *et al.* (2001) já demonstraram que parasitos que são menos suscetíveis aos efeitos do PZQ *in vivo* também são menos suscetíveis ao fármaco em experimentos *in vitro*.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Seleção um isolado de *S. mansoni* resistente ao PZQ utilizando pressão quimioterápica em *B. glabrata* infectada com o parasito.

3.2 Objetivos específicos

Induzir resistência ao PZQ em cepa LE de *S. mansoni* utilizando sucessivos tratamentos em *B. glabrata* infectada;

Testar comparativamente a resistência/tolerância das duas linhagens de *S. mansoni*, com e sem pressão quimioterápica, por uso ao PZQ através de perfusão dos animais para avaliação da carga parasitária ou cultivo dos vermes, em experimentos com camundongos;

Comparar as alterações causadas pelo PZQ no sistema excretor de vermes adultos da linhagem submetida à pressão quimioterápica na fase intramolusco com a linhagem LE padrão por meio da sonda resorufim em microscopia de fluorescência;

Comparar a linhagem submetida à pressão quimioterápica na fase intramolusco e a linhagem LE padrão quanto às alterações causadas pelo fármaco no tegumento de vermes adultos por meio da sonda Hoechst 33258 em microscopia de fluorescência.

MATERIAIS E MÉTODOS

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Avaliação da suscetibilidade do *S. mansoni* ao PZQ após tratamentos sucessivos na fase intramolusco

Para verificar se o PZQ é capaz de gerar alguma alteração na suscetibilidade do *S. mansoni* quando caramujos infectados foram submetidos a sucessivos tratamentos com este fármaco, observam-se os protocolos delineados a seguir.

4.1.1 Primeira Etapa

4.1.1.1 Caramujos e Parasitos

Duzentos caramujos da espécie *B. glabrata*, linhagem Barreiro de Cima, mantidos rotineiramente pelo Moluscário do Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ, foram utilizados. Os parasitos usados foram *S. mansoni*, cepa LE, mantida no Centro de Pesquisa René Rachou/ FIOCRUZ, onde o ciclo do parasito é mantido rotineiramente por mais de 50 anos.

4.1.1.2 Infecção e exame dos caramujos

Caramujos foram expostos, segundo a técnica descrita por Souza (1993), a 10 miracídios de *S. mansoni*, da cepa LE. Trinta dias após a exposição aos miracídios, os caramujos foram colocados em beckeres contendo 2mL de água desclorada e expostos à luz artificial por 40 minutos. Posteriormente, foram examinados em lupa para verificar a presença ou não de cercárias. Apenas os caramujos positivos foram utilizados no experimento.

4.1.1.3 Tratamento dos caramujos com PZQ

Os caramujos que estavam eliminando cercárias foram separados em dois grupos: caramujos infectados e tratados com PZQ (Cestox – MERCK), rotulados como IT, e caramujos infectados e não tratados, chamados I. Os caramujos foram pesados e com a média do peso encontrada foi realizado o cálculo para 100mg/Kg de PZQ, que foi incorporado a 100mg de ração, quantidade que equivale à alimentação diária de cada caramujo. Para isso, a ração para camundongo da marca Nuvital - Nuvilab (composição: milho integral, farelo de soja, farelo de trigo, carbonato de cálcio, fosfato bicálcio, cloreto de sódio, premix vitamínico, aminoácidos) foi utilizada. Essa ração foi autoclavada, triturada e a ela incorporados 10% de carbonato de cálcio. Para o tratamento foi adicionada água, até que a ração adquirisse uma consistência pastosa e possibilitasse a adição do medicamento. Após a adição do fármaco, a

mistura foi homogeneizada e separada em porções de 100mg. Os caramujos não tratados foram mantidos sob as mesmas condições, porém sem adição de PZQ à ração.

Os caramujos foram mantidos individualmente, em copos plásticos com 200mL de água desclorada. Três tratamentos foram realizados, cada um com duração de cinco dias, sendo observada uma semana de intervalo entre cada tratamento. Os caramujos ingeriam ração, com ou sem PZQ, sendo esta adicionada diariamente. Na semana de intervalo entre um tratamento e outro, os caramujos foram examinados e, na semana seguinte, iniciado o tratamento subsequente. Ao final do terceiro tratamento, os caramujos passaram a ser examinados semanalmente para verificar quando voltariam a eliminar cercárias novamente. Na semana em que os caramujos voltaram a eliminar cercárias em quantidade suficiente, camundongos foram infectados para a continuidade dos estudos, desde que o total de cercárias eliminadas permitisse a montagem de protocolos para infecção do número de camundongos necessários.

4.1.2 Segunda Etapa

4.1.2.1 Animais e parasitos

Camundongos swiss, fêmeas, com aproximadamente 20g, foram utilizados como modelo experimental nesta segunda fase do experimento. Para a infecção dos camundongos, foram utilizadas cercárias da cepa LE de *S. mansoni*, previamente submetida a 3 tratamentos com PZQ na fase intramolusco, denominada LE-PZQ, e cercárias da cepa LE não submetida ao tratamento com PZQ, que serviu como base de comparação.

Os procedimentos realizados com os animais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ) e aprovados sob o número P-0340/07.

4.1.2.2 Infecção dos camundongos

Os caramujos foram expostos à luz por 2 horas e o líquido contendo as cercárias foi transferido para um único becker, originando um *pool* de cercárias provenientes de caramujos LE – PZQ (pré-expostos ao fármaco) e outro LE (controle). De cada becker, foi retirada uma alíquota de, aproximadamente, 0,3mL para serem contadas com auxílio de uma lupa. As alíquotas foram ajustadas, a fim de se obter uma concentração equivalente a 25 ± 5 cercárias, em um volume de 0,3mL.

Os camundongos foram inoculados no dorso, individualmente, por via subcutânea, segundo a técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968). A infecção foi realizada utilizando uma seringa de aço-inox com volume ajustável.

4.1.2.3 Tratamento experimental em camundongos

Após 45 dias de infecção, os animais foram pesados e divididos em 8 grupos, 4 com camundongos infectados com cepa LE e outros 4 com LE-PZQ, cada grupo contendo 12 animais. Os comprimidos de PZQ foram pesados e, posteriormente, realizado o cálculo do fator de correção (considerando-se apenas o princípio ativo, excluindo-se o excipiente). Com ajuda de pistilo, os comprimidos foram macerados e diluídos em água. O fármaco foi administrado com auxílio de seringa de gavagem por via oral, em dose única. Os camundongos foram tratados com PZQ nas dosagens de 200, 400 e 800mg/kg. Os grupos e os esquemas terapêuticos que foram utilizados estão descritos no Quadro 1.

| Grupos | Infecção | Dosagem (PZQ) |
|--------|----------|---------------|
| 1 | LE | 200mg/Kg |
| 2 | LE - PZQ | 200mg/Kg |
| 3 | LE | 400mg/Kg |
| 4 | LE - PZQ | 400mg/Kg |
| 5 | LE | 800mg/Kg |
| 6 | LE - PZQ | 800mg/Kg |
| 7 | LE | Controle |
| 8 | LE - PZQ | Controle |

Quadro 1- Esquemas Terapêuticos

Legenda: LE-PZQ: cepa LE de *S. mansoni* submetida a 3 tratamentos na fase intramolusco do parasito; LE: cepa de *S. mansoni* não submetida a tratamento com PZQ (controle). Distribuídos 12 camundongos por grupo.

4.1.2.4 Recuperação de vermes

Trinta dias após o tratamento, os grupos tratados foram sacrificados por fratura cervical (exceto os grupos controles, que foram sacrificados 45 dias após a infecção). A perfusão foi realizada seguindo-se a técnica descrita por Pellegrino & Siqueira (1956), resumidamente: o conteúdo visceral foi exposto; fígado e mesentério foram separados pela ligadura da veia renal e a veia porta foi seccionada. Com o auxílio de uma agulha, acoplada a um pipetador automático (Brewer), solução salina 0,85% heparinizada foi injetada na aorta descendente, permitindo, assim, a perfusão do sistema porta e das veias mesentéricas,

recuperando-se os vermes presentes. Adicionalmente foi realizada a perfusão do fígado através da injeção de salina 0,85%, heparinizada, no hilo hepático. Os vermes foram, então, coletados em placas de petri, contados e separados em macho, fêmea e acasalados com auxílio de lupa.

Os fígados de outros animais, após 50 dias de infecção, do isolado LE-PZQ, foram processados de acordo com Souza (1993) e os miracídios obtidos foram utilizados para infectar novos caramujos e dar seguimento ao ciclo do parasito, seguindo protocolo já descrito.

4.1.2.5 Análise estatística

Testes estatísticos utilizando o número de vermes vivos recuperados em cada grupo foram utilizados para avaliar uma possível alteração na susceptibilidade ao PZQ do *S. mansoni*, após tratamentos na fase intramolusco. Foi realizada uma comparação entre a média de vermes vivos recuperados dos camundongos infectados com a cepa LE e o isolado LE-PZQ, tratados com dosagens de 200, 400 ou 800mg/Kg de PZQ. No caso de dados paramétricos, utilizou-se o Teste *t* de Student e, no caso de dados não paramétricos, foi realizado o teste de Mann-Whitney. O teste de Kruskal-Wallis, seguido das comparações múltiplas de Dunn's, foi utilizado para avaliar o efeito das diferentes doses de PZQ (200, 400, 800mg/Kg) nos vermes da cepa LE e LE-PZQ, em comparação com os respectivos grupos controles. Todas as análises deste estudo foram realizadas com 5% de significância, utilizando-se os programas estatísticos MINITAB 13 e PRISMA 4.

A porcentagem de redução da carga parasitária em cada grupo tratado foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$\% \text{ redução} = \frac{(\text{média de vermes no grupo controle} - \text{média de vermes no grupo tratado})}{\text{média de vermes no grupo controle}} \times 100$$

Os cálculos da ED₅₀ foram realizados utilizando o software PRISMA 4, usando curva sigmoidal.

4.2 Cultivo de vermes

4.2.1 Recuperação e cultivo de vermes

Camundongos infectados com 100 ± 10 cercárias LE-PZQ e LE, após 45 dias da infecção, foram tratados com 400mg/Kg de PZQ, conforme já descrito acima. Os grupos controle, LE ou LE-PZQ, não foram submetidos ao tratamento. Após 2 horas, os camundongos foram perfundidos seguindo a técnica de perfusão retrógrada do fígado descrita

por Smithers & Terry (1965). Resumidamente: os camundongos foram sacrificados por *overdose* de pentobarbital sódico 3% (Hypnol - Fontoveter), administrado por via intraperitoneal ($\pm 0,3\text{mL}$). Posteriormente, as vísceras abdominais e o coração foram expostos, a veia porta foi seccionada com o auxílio de uma agulha conectada a uma seringa de 10mL. Imediatamente, na parte inferior dos ventrículos do coração, foi injetado meio de cultura RPMI – 1640 (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA), pH 7,4 e 0,2% de heparina, obtendo-se, assim, os parasitos. Estes foram lavados com meio RPMI – 1640. Os vermes recuperados foram colocados em meio de cultura acrescido de 5% de soro fetal bovino (SFB – Gibco Limited, Paisley, Scotland, U.K) e 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de antibiótico penicilina/estreptomicina (Sigma) na estufa 37°C e 5% de CO₂, por aproximadamente 30 minutos (Oliveira *et al.*, 2006).

Os vermes foram colocados em placa de cultura de tecidos. Quatro pares de vermes foram colocados em cada poço, sendo poços com vermes do isolado LE-PZQ ou da cepa LE, tratados com PZQ, e poços com vermes não tratados. Em cada poço, os vermes foram mantidos em 4ml de meio de cultura RPMI – 1640 acrescido de 5% de SFB e 100 $\mu\text{L}/\text{ml}$ de antibiótico penicilina/estreptomicina e observados no microscópio invertido por 7 dias.

4.3 Avaliação da atividade excretora e do dano causado no tegumento por sondas fluorescentes

4.3.1 Avaliação da atividade excretora após adição de PZQ *in vitro*

Camundongos infectados com 100 ± 10 cercárias LE-PZQ e LE, após 45 dias da infecção, foram perfundidos, seguindo a técnica de perfusão retrógrada do fígado descrita por Smithers & Terry (1965), já mencionada anteriormente. Quatro pares de vermes foram colocados em placas de cultura de tecidos, mantidos em 4mL de meio de cultura RPMI – 1640, acrescido de 5% de SFB e 100 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de antibiótico penicilina/estreptomicina, sendo poços com vermes do isolado LE-PZQ ou da cepa LE. Em seguida, foi adicionado a cada poço 10 μL de sonda resorufim (Sigma – solução estoque 10mg/mL) e colocados em estufa 37°C e 5% de CO₂ por 30 minutos. Após serem lavados por cinco vezes para retirada do excesso de sonda, acrescentaram-se 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de PZQ (Cestox® – Merck; sol. estoque 0,8mg/mL), sendo mantidos poços sem a adição do fármaco. Posteriormente, foram colocados em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 15 minutos. Os vermes foram novamente lavados por cinco vezes com meio de cultura, transferidos para lâminas delimitadas com vaselina para evitar o extravasamento dos vermes e levados para observação em microscópio de

fluorescência (Karl Zeiss Axiostar Plus filtro com Rodamina - excitação/emissão máxima do resorufim 571/585nm).

4.3.2 Avaliação de dano no tegumento

4.3.2.1 Avaliação de dano no tegumento após adição do PZQ *in vitro*

Camundongos infectados com 100 ± 10 cercárias LE-PZQ e LE, após 45 dias da infecção, foram perfundidos seguindo a técnica de perfusão retrógrada do fígado descrita por Smithers & Terry (1965), já descrita anteriormente. Quatro pares de vermes foram distribuídos em placa de cultura de tecidos, separando-os em poços com vermes do isolado LE-PZQ e poços com vermes da cepa LE. Os vermes foram mantidos em 2mL de meio de cultura RPMI – 1640, acrescido de 5% de SFB e 100 μ L/mL de antibiótico penicilina/estreptomicina. Em seguida, foram adicionados 2 μ g/mL de PZQ (sol. estoque 0,4mg/mL), sendo mantidos poços sem o fármaco, e colocados em estufa 37°C e 5% de CO₂ por 1 hora. Posteriormente, foram lavados por cinco vezes com meio de cultura para retirada do fármaco. Então, acrescentaram-se 10 μ L da sonda Hoechst 33258 (Sigma; solução estoque 10mg/mL) e os vermes foram incubados novamente por 15 minutos em estufa 37°C e 5% de CO₂. Os vermes foram lavados por cinco vezes com meio de cultura, transferidos para lâminas delimitadas com vaselina para evitar o extravasamento dos vermes e levados para observação em microscópio de fluorescência (Karl Zeiss Axiostar Plus filtro com DAPI - excitação/emissão máxima da Hoechst 33258 352/455 nm).

4.3.2.2 Avaliação de dano no tegumento após tratamento *in vivo* com PZQ

Camundongos infectados com 100 ± 10 cercárias LE-PZQ e LE, após 45 dias da infecção, foram tratados com 400mg/Kg de PZQ conforme já descrito acima. Os grupos controle LE e LE-PZQ não foram submetidos ao tratamento. Após 2 horas, os camundongos foram perfundidos seguindo a técnica de perfusão retrógrada do fígado descrita por Smithers & Terry (1965), já descrita anteriormente. Quatro pares de vermes foram distribuídos em placa de cultura de tecidos, separando-os em poços com vermes do isolado LE-PZQ e poços com vermes da cepa LE. Os vermes foram mantidos em 2mL de meio de cultura RPMI – 1640 acrescido de 5% de SFB e 100 μ L/mL de antibiótico penicilina/estreptomicina. Posteriormente, acrescentaram-se 10 μ L da sonda Hoechst 33258 (Sigma; solução estoque 10mg/mL), e os vermes foram incubados novamente por 15 minutos em estufa 37°C e 5% de CO₂. Os vermes foram lavados por cinco vezes com meio de cultura, transferidos para lâminas delimitadas com vaselina para evitar o extravasamento dos vermes e levados para

observação em microscópio de fluorescência (Karl Zeiss Axiostar Plus filtro com DAPI - excitação/emissão máxima da Hoechst 33258 352/455 nm).

4.4 Imagens fotográficas

As imagens deste trabalho foram obtidas com máquina fotográfica Canon EOS Digital Rebel XT.

RESULTADOS: ARTIGOS

5 RESULTADOS: ARTIGOS

5.1 Artigo 1

Couto FFB, Coelho PMZ, Araújo N, Kusel JR, Katz N, Jannotti-Passos LK, Mattos ACA. Method for inducing resistance to praziquantel using *Biomphalaria glabrata* snails infected with *Schistosoma mansoni*. Parasitol In press 2010.

Parasitology



***Schistosoma mansoni*: method for inducing resistance to praziquantel using *Biomphalaria glabrata* snails infected with LE strain**

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>Parasitology</i> |
| Manuscript ID: | PAR-2010-0130 |
| Manuscript Type: | Research Article |
| Date Submitted by the Author: | 13-Apr-2010 |
| Complete List of Authors: | Couto, Flávia Fernanda; CPqRR/FIOCRUZ, Schistosomiasis Laboratory Coelho, Paulo Marcos; CPqRR/FIOCRUZ, Schistosomiasis Laboratory Araújo, Neusa; CPqRR/FIOCRUZ, Schistosomiasis Laboratory Kusel, John; University of Glasgow Katz, Naftale; CPqRR/FIOCRUZ, Schistosomiasis Laboratory Jannotti Passos, Liana; CPqRR/ FIOCRUZ, Moluscário Mattos, Ana Carolina; CPqRR/FIOCRUZ, Schistosomiasis Laboratory |
| Key Words: | <i>Schistosoma mansoni</i> , <i>Biomphalaria glabrata</i> , praziquantel, resistance induction, new method |



1 *Schistosoma mansoni*: method for inducing resistance to praziquantel using

2 *Biomphalaria glabrata* snails infected with LE strain

3

4 F. F. B. COUTO¹, P. M. Z. COELHO*¹, N. ARAÚJO¹, J. R. KUSEL², N. KATZ¹, L. K.

5 JANNOTTI-PASSOS³ and A. C. A. MATTOS*¹

6

7 ¹Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachow/FIOCRUZ, Belo

8 Horizonte, MG, Brazil

9 ²Division of Infection and Immunity, IBLS, University of Glasgow, Scotland, UK

10 ³Moluscário "Lobato Paraense", Centro de Pesquisas René Rachow/FIOCRUZ, Belo

11 Horizonte, MG, Brazil

12

13

14 Running title: Resistance to praziquantel using *S. mansoni* infected snails

15

16 * Corresponding authors: Tel: +55 31 3349 7740/ +55 31 3349 7759. Fax: +55 31 3295

17 3115. E-mail: coelhojm@cpqrr.fiocruz.br / anademattos@cpqrr.fiocruz.br

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29

30

31 SUMMARY

32 *Schistosoma mansoni* laboratory isolates resistant to antischistosomal drug are essential
33 to further an understanding of the mechanisms of resistance. We evaluated a new
34 method for inducing resistance to praziquantel (PZQ), using successive PZQ treatments
35 of *Biomphalaria glabrata* snails infected with the parasite. Infected *B. glabrata* snails
36 were submitted to three treatments, each of them with 100 mg/kg PZQ, for 5
37 consecutive days. After the treatment, the cercariae (named LE-PZQ) produced from
38 these snails and LE strain (susceptible) were used to infect mice, as control. Forty-five
39 days after infection, mice were treated with 200, 400 and 800 mg/kg PZQ. Thirty days
40 post-treatment, it was observed that the mean number of live worms recovered by
41 perfusion was significantly higher in the group of mice infected with LE-PZQ isolate
42 and treated with 200 and 400 mg/kg, when compared with the LE strain submitted to
43 the same treatment. Moreover, there were significant differences between ED₅₀ (the
44 effective dose required to kill 50% worms) of the LE-PZQ (362 mg/kg) and LE (68
45 mg/kg). In the assays carried out *in vitro*, the worms of LE-PZQ isolate exhibited less
46 susceptibility to PZQ. Thus, we report a practical and fast technique to select resistant *S.*
47 *mansoni*.

48
49 **Key words:** *Schistosoma mansoni*, *Biomphalaria glabrata*, praziquantel, resistance
50 induction, new method.

51
52
53
54
55
56
57
58

59 INTRODUCTION

60 The current strategy for schistosomiasis control is based on large scale treatments of
61 populations, aiming at reducing disease morbidity (WHO, 2002). Currently,
62 praziquantel (PZQ) is the drug of choice (Utzinger and Keiser, 2004; Fenwick and
63 Webster, 2006) with the main advantages of being orally administered, in a single dose,
64 of low toxicity and low cost (Fenwick *et al.* 2003; Utzinger and Keiser, 2004). Despite
65 the advantages of PZQ, there is a discussion regarding the development of *Schistosoma*
66 *mansoni* resistance to PZQ, both under laboratory and field conditions (Abdul-Ghani *et*
67 *al.* 2009). In the laboratory, the process of induction of resistance is based on the
68 treatment of mice infected with *S. mansoni*, using initially sub-curative doses of PZQ,
69 and after which it is necessary to increase the dosage for at the least 7 passages in
70 mice/snails in order to complete the life cycle of the parasite for each passage (Ismail *et*
71 *al.* 1994; Fallon *et al.* 1995).

72 At the present time, the mechanisms of action of PZQ are still unclear (Doenhoff
73 *et al.* 2008). It is important to obtain resistant strains for evaluation of such mechanisms,
74 as well as for the development of alternative drugs for schistosomiasis treatment and
75 control. Preliminary studies showed that PZQ is active not only on adult worms, but
76 also on the intramolluscan phase of the parasite (Coelho *et al.* 1988; Mattos *et al.* 2006,
77 2007). Using this observation, this paper reports a novel method for induction of
78 resistance to PZQ, using successive treatments of infected *Biomphalaria glabrata*
79 snails.

80

81 MATERIALS AND METHODS

82 *Parasites and hosts*

83 The *S. mansoni* (LE strain) life cycle was maintained using *B. glabrata* (Barreiro de
84 Cima strain) snails as intermediate host and Swiss mice as definitive host, according to
85 Pellegrino & Katz (1968) and Souza *et al.* (1995).

86

87 *Perfusion of adult worms from infected mice*

88 Two methods were used. The methodology described by Pellegrino and Siqueira (1956)
89 uses a needle attached to a Brewer's automatic pippeter to inject saline solution under
90 pressure into the descendent aorta, and afterthat into the hepatic hilum of mice after
91 sectioning the portal vein, thus allowing the perfusion of the portal system and
92 mesenteric veins, recovering all the detected worms in order to perform the counting. In
93 the methodology described by Smithers and Terry (1965) culture medium is gently
94 injected by means of a syringe, manually, at the bottom of the ventricles of the infected
95 mice's heart, thus possible to obtain worms. Using this methodology, with a lower
96 pressure injection it is not possible to recover all the worms, but the integrity of the
97 parasite's tegument is preserved. Therefore, this methodology is ideal for recovery of
98 worms, which will be cultivated or for evaluation of other parameters, such as
99 tegumental integrity and excretory activity.

100

101 *Induction of resistance to PZQ in the intramolluscan phase*

102 Two-hundred *B. glabrata* were individually infected with 10 *S. mansoni* miracidia
103 according to Mattos *et al.* (2007). Thirty days post-infection, the snails were exposed to
104 artificial light for 1 hour, to verify that they were infection positive, as described by
105 Souza *et al.* (1995). The positive snails (those shedding cercariae) were divided into two
106 groups (I – infected snail or IT – infected snails treated with PZQ). The snails were
107 individually weighed using Marte-A200 balance. The mean weight of the group was

108 used to calculate the drug dosage to be administered. The snails were treated
109 individually with 100 mg/kg PZQ for 5 consecutive days in plastic glasses containing
110 200 ml dechlorinated water, which was changed daily. This treatment was repeated 3
111 times, with 1 week intervals between the treatments. PZQ was added to the daily 100
112 mg of food allowance, and the untreated snails received daily the same amount of food
113 without PZQ, as described by Mattos *et al.* (2007). The daily food amount was totally
114 ingested by each snail which infers that the snails received all the drug offered in ration.
115 At the end of the treatment, the snails were exposed each week to artificial light until it
116 was observed that cercarial shedding occurred in sufficient number for use in the
117 infection of mice.

118

119 *Evaluation of PZQ pressure on parasite at the intramolluscan phase*120 *Treatment with praziquantel*

121 Mice were infected with 25 *S. mansoni* cercariae, by the subcutaneous route, as
122 described by Pellegrino and Katz (1968), to study the effect of PZQ pressure on the
123 parasite, in the intramolluscan phase. Forty-eight mice were infected with cercariae
124 derived from snails submitted to treatment with PZQ, named LE-PZQ isolate, and
125 another 48 mice infected with cercariae developed from untreated snails, named LE
126 strain. Forty-five days after infection, mice were divided into groups (12 mice in each
127 group), and treated with 200, 400 or 800 mg/kg PZQ single oral dose. An untreated
128 group was included as a control. Thirty-three days after treatment, mice were subjected
129 to perfusion according to Pellegrino and Siqueira (1956) for evaluation of worm burden
130 reduction. The percentage of the reduction for each group and each experiment was
131 calculated according to the following formula:

132 % reduction = $\frac{(\text{mean of worms in control group} - \text{mean of worms in control treated})}{(\text{mean of worms in control group})} \times 100$
133

134 The mean of worm reduction related to the experiments 1 and 2 for each PZQ
135 dose was then calculated, and based on this calculation, the effective dose to kill 50%
136 the worms (ED₅₀) estimated. Data were analyzed using MINITAB 13 and GraphPad
137 Prism 4 computer software using the sigmoidal curve, with 5% significance.

138

139 *In vitro observation of worms treated with praziquantel*

140 Mice infected with 100 cercariae derived from *S. mansoni* LE or LE-PZQ isolates were
141 treated with 400 mg/kg PZQ, 45 days post-infection. Two hours later, mice were
142 perfused according to the technique described by Smithers and Terry (1965), using
143 RPMI 1640 medium with 2% heparin as perfusate. Four pairs of worms originated from
144 LE or LE-PZQ isolates were put in 6-well culture plates containing, in each well, 4 ml
145 RPMI 1640 supplemented with 5% foetal bovine serum (FBS), and 100 µg/ml of
146 antibiotics penicillin and streptomycin and cultivated in a 5% CO₂ incubator for 8 days,
147 at a temperature of 37°C. The worms derived from LE or LE-PZQ isolates, recovered
148 from untreated mice, were also cultivated and used as a control for the experiment.

149

150 RESULTS

151 *Evaluation of PZQ pressure in parasite at the intramolluscan phase*

152 *Treatment with praziquantel*

153 In this first experiment, two doses of PZQ (400 and 800 mg/kg) were tested on LE and
154 LE-PZQ isolates. A statistically significant difference (p<0.03) was observed between
155 the mean of worms recovered from LE-PZQ (1.9) and the mean from LE (control) strain
156 (0.42); the percentage reduction of worms from LE-PZQ (43.5%) isolate and that one
157 found for worms from LE strain (85.6%) when both were exposed to 400 mg/kg PZQ,
158 thus suggesting that LE-PZQ isolate showed a reduction of susceptibility. When the

159 higher dose of 800 mg/kg was used, no significant difference could be observed
160 between the isolates (Table 1).

161 In the second experiment, three doses of PZQ (200, 400 and 800 mg/kg) were
162 used. The mean of worm recovered from LE-PZQ isolate treated with 200 mg/kg (mean
163 of worm 9.7) and treated with 400 mg/kg (mean of worm 5.1) was significantly lower
164 ($p < 0.002$ and $p < 0.01$, respectively) than the mean of worm recovered from the groups
165 infected with cercariae derived from the LE strain and treated with 200 mg/kg (mean of
166 worm 3.0) and 400 mg/kg (mean of worm 0.6). Moreover, the percentage reduction of
167 worms was: LE-PZQ treated with 200 mg/kg: 8.8%; LE-PZQ treated with 400 mg/kg:
168 52.3%; LE treated with 200 mg/kg: 71.7% and LE treated with 400 mg/kg: 94.3%.
169 Corroborating the previous result, no statistically significant difference between the
170 isolates could be detected, when they were submitted to the dose of 800 mg/kg (Table
171 1).

172 The mean of worm reduction related to the experiments 1 and 2 was calculated
173 for each PZQ dose (200, 400 and 800 mg/kg) (Table 2, Graph 1). Based on these means,
174 the ED_{50} values obtained were 68 mg/kg and 362 mg/kg for the LE and LE-PZQ
175 isolates, respectively, these values being significantly different ($p < 0.01$) (Table 2). The
176 ED_{50} for the LE-PZQ isolate was 5.3 times higher than that for the LE strain. The results
177 obtained show that there is a reduction in *S. mansoni* susceptibility to PZQ, when the
178 parasite is submitted to PZQ treatment at the intramolluscan phase.

179

180 *In vitro* observation of worms treated with PZQ

181 It was observed that the parasites of LE strain derived from mice treated with 400
182 mg/kg PZQ were more contracted (Fig. 1A) than the parasites of LE-PZQ isolate
183 submitted to the same PZQ dose (Fig. 1B). Additionally, more than 300 eggs from total

184 number of cultured worms were detected in worm culture of the LE-PZQ isolate
185 submitted to treatment with 400 mg/kg. Further, eggs in all stages could be observed
186 after 8 days (Fig. 1D). On the other hand, in worm culture of the LE strain derived from
187 mice treated with 400 mg/kg PZQ, only a lower number of dead eggs (± 30 from total
188 number of cultured worms) was detected (Fig. 1C). The controls for untreated LE and
189 LE-PZQ isolates, presented similar alive eggs from 1st stage to mature (Figs. 1E and F).
190 These results corroborate the data obtained in the treatment with PZQ experiments,
191 suggesting a reduction of worm susceptibility (LE-PZQ isolate) to the drug.

192

193 DISCUSSION

194 According to Ross *et al.* (1993) and Liang *et al.* (2003), the process of drug pressure for
195 selection of resistance can be carried out in the laboratory. This is of importance since
196 resistant parasites may be a key to the elucidation of the mechanisms of action of the
197 drug PZQ.

198 Various studies have already demonstrated that antischistosomal drugs effective
199 against adult and immature *S. mansoni* worms in the vertebrate host, including PZQ, are
200 also effective at the intramolluscan stage of the parasite, leading to interruption of
201 shedding of cercariae (Warren and Weisberg, 1966; Warren, 1967; Coles, 1979;
202 Touassem and Combes, 1986; Coles and Bruce, 1987; Yi and Combes, 1987; Coelho *et al.*
203 *et al.* 1988; Riley and Chappell, 1990; Mattos *et al.* 2006, 2007). The energy metabolism
204 of the cercaria and miracidium involves the breakdown of glucose under aerobic
205 conditions (Horemans *et al.* 1992; Tielens *et al.* 1991). According to Horemans *et al.*
206 (1992) after entry into the mammalian host, cercariae use glucose by anaerobic
207 glycolysis, but the aerobic pathways are still functional. The same process happens
208 when miracidium enters into the snail (Tielens *et al.* 1992). Recent works by Verjovski-

209 Almeida *et al.* (2003) and Dillon *et al.* (2006) has shown that the sporocyst and the
210 mammalian stages of the schistosome share many common genes. Moreover, Coles
211 (1973) showed that sporocysts consume oxygen and produce lactic acid, in the same
212 way as in adult worms and the enzymes present in sporocysts also migrate in
213 electrophoresis in a similar manner to the adult worms' enzymes. Coelho *et al.* (1988)
214 suggest that similar metabolic routes could be present at the intramolluscan stage and in
215 *S. mansoni* adult worms, and this could explain the evidence that antischistosomal drugs
216 effective against adult worms in the vertebrate host are also effective on the
217 intramolluscan phase of the parasite.

218 Mattos *et al.* (2007) tested different doses and schedules of PZQ in infected *B.*
219 *glabrata*, and observed that one treatment with 1000 mg/kg PZQ significantly
220 interrupted the cercarial shedding (almost 90%) until approximately 30 days after the
221 end of treatment, whereas treatments with other drug formulations (500 mg/kg PZQ
222 and 250 mg/kg oxamniquine, in association) eliminated the parasite from the snails.
223 Thus, the dose of 100 mg/day/snail used in this study represents a dose lower than this
224 curative dose, which eliminates the parasite. Furthermore, three treatments were carried
225 out for five consecutive days aiming at exposing the parasite periodically to PZQ, in an
226 attempt to select or induce resistance.

227 The results here presented demonstrate that adult worms of the LE-PZQ isolate
228 were less susceptible to PZQ, at the doses of 200 and 400 mg/kg, than the worms
229 derived from the control strain (LE). Statistically significant results were not observed
230 between the LE and LE-PZQ isolates, at the dose of 800 mg/kg. This dose was deemed
231 to be too high (double the curative dose), being able to overcome the resistance of the
232 selected parasite. The results obtained in the treatment with PZQ experiment
233 corroborate the results of the *in vitro* observation of worms treated with PZQ, since the

234 adult worms of the LE-PZQ isolate were found to be less susceptible to the drug. The
235 exact mechanisms of action of PZQ is still unclear (Doenhoff *et al.* 2008), but it is well
236 known that PZQ causes a severe muscular contraction, due to the intense calcium influx
237 (Pax *et al.* 1987), immediate tegumental lesions (Harnett and Kusel, 1986), reduction of
238 glutathione levels (Ribeiro *et al.* 1998) and interruption of the excretory activity of adult
239 worms (Kusel *et al.* 2006, 2007; Oliveira *et al.* 2006). After 8 days of culture the adult
240 worms of the LE strain presented typical alterations in morphology of parasites
241 susceptible in contact to the drug: intense contraction, reduced oviposition, as well as
242 tegumental changes. On the other hand, in the worms of LE-PZQ isolate, PZQ was not
243 able to cause the same alterations in the motility and oviposition of the worms. The
244 results obtained in the *in vitro* experiment are of particular significance, since they allow
245 us to observe the worm condition immediately after contact with PZQ.

246 We found that ED₅₀ for LE-PZQ isolate was higher than for LE strain in both
247 experiments, and this parameter has been used to compare susceptible and resistant
248 strains. Cioli *et al.* (2004) estimated the ED₅₀ from 4 susceptible and 5 putatively PZQ-
249 resistant strains. The authors observed considerable strain differences, and they
250 concluded that the value of ED₅₀ will be useful for establishing and monitoring the drug
251 susceptibility/resistance profiles of the parasite strain. Further, they observed that the
252 ED₅₀ value was 3 times higher in the resistant isolates, when compared with the
253 susceptible isolates. Our results show demonstrated that the ED₅₀ related to the LE-PZQ
254 isolate was 5.3 times higher in comparison with the ED₅₀ for the LE strain (susceptible).
255 Fallon *et al.* (1996) believe that the ED₅₀ for resistant isolates should be at the least five
256 times higher than that for those isolates susceptible to the drug. Nevertheless, according
257 to Bennett *et al.* (1997), the ED₅₀ for killing 50% of the adult worms from resistant

258 isolates can be 3-5 times higher than the ED₅₀ for those from susceptible isolates. Our
259 results corroborate these conditions.

260 According to Fallon *et al.* (1996), the various experiments dealing with
261 induction of resistance performed in the laboratory, using successive passages and
262 treatments in mice, are time-consuming and use dissimilar methodologies, thus
263 rendering difficult a comparison of the analysis of the data between them. Therefore, the
264 use of the snail as an experimental model for development of resistance in *S. mansoni* is
265 a fast, simple and inexpensive method.

266 The study by Fallon and Doenhoff (1994), aiming at selecting *S. mansoni*
267 isolates resistant to PZQ in the laboratory, was carried out with several passages using
268 the entire life cycle in mice and snails, the infected mice being submitted to treatments
269 with increasing doses of PZQ. This model for selection of resistant *S. mansoni* lineage
270 is a complex and time-consuming method, which is able to select parasites at the adult
271 worm phase. In the present article, the chemotherapeutic pressure occurs on a higher
272 number of parasites (sporocysts and cercariae) in the snail intermediate host. Thus, the
273 selection of resistant strains in the laboratory using *S. mansoni* at the intramolluscan
274 phase might be more useful, and this approach may be very important in studies
275 concerning the development of novel antischistosomal drugs, and in those aimed at
276 gaining a better understanding of the mechanisms related to resistance.

277

278 ACKNOWLEDGEMENTS

279 We thank Vera de Paula Ribeiro for translating our manuscript from Portuguese into
280 English. We are grateful to the technicians of the Mollusc Room and the Centro de
281 Pesquisa René Rachou/Fiocruz, for providing the parasites. This investigation received
282 financial support from CNPq and CAPES.

283 REFERENCES

- 284 **Abdul-Ghani, R., Loutfy, N., El-Sahn, A. and Hassan, A.** (2009). Current
285 chemotherapy arsenal for schistosomiasis mansoni: alternatives and challenges.
286 *Parasitology Research* **104**, 955-965.
- 287 **Bennett, J. L., Day, T., Feng-Tao, L., Ismail, M. and Farghaly, A.** (1997). The
288 development of resistance to anthelmintics: a perspective with an emphasis on the
289 antischistosomal drug praziquantel. *Experimental Parasitology* **87**, 260-267.
- 290 **Cioli, D., Botros, S. S., Wheatcroft-Francklow, K., Mbayne, A., Southgate, V.,**
291 **Tchuem Tchuente, L. A., Pica-Mattoccia, L., Troiani, A. R., Seif el-Din, A. H.,**
292 **Sabra, A. N. A., Albin, J., Engels, D., and Doenhoff, M. J.** (2004). Determination of
293 ED₅₀ values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma*
294 *mansoni* isolates. *International Journal for Parasitology* **34**, 979-987.
- 295 **Coelho, P. M. Z., Katz, N., Rocha, M. O., Souza, C. P. and Mello, R. T.** (1988).
296 *Schistosoma mansoni*: infected snails as a tool to screen antischistosomal drugs.
297 *International Journal for Parasitology* **18**, 167-170.
- 298 **Coles, G. C.** (1979). The effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. *Journal of*
299 *Helminthology* **53**, 31-33.
- 300 **Coles, G. C. and Bruce, J.I.** (1987). *In vitro* selection of drug resistant *Schistosoma*
301 *mansoni*. *International Journal for Parasitology* **17**, 767-771.
- 302 **Dillon, G. P., Feltwell, T., Skelton, J. P., Ashton, P. D., Coulson, P. S., Quail, M. A.,**
303 **Nikolaidou-Katsaridou, N., Wilson, R. A. and Ivens, A. C.** (2006). Microarray
304 analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of
305 *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology* **36**, 1-8.

- 306 **Doenhoff, M. J., Cioli, D. and Utzinger, J.** (2008). Praziquantel: mechanisms of
307 action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in*
308 *Infectious Diseases* **21**, 659-667.
- 309 **Fallon, P. G. and Doenhoff, M. J.** (1994) Drug resistant schistosomiasis: resistance to
310 praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific.
311 *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **51**, 83 – 8.
- 312 **Fallon, P. G., Sturrock, R. F., Capron, A., Niang, M. and Doenhoff, M. J.** (1995).
313 Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*.
314 *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **53**, 61-62.
- 315 **Fallon, P. G., Tao, L. F., Ismail, M. M., and Bennett, J. L.** (1996). *Schistosome*
316 resistance to praziquantel: fact or artifact? *Parasitology Today* **2**, 316-320.
- 317 **Fenwick, A., Savioli, L., Engels, D., Bergquist, N. R. and Todd, M. H.** (2003).
318 Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in
319 schistosomiasis. *Trends in Parasitology* **19**, 509-515.
- 320 **Fenwick, A. and Webster, J. P.** (2006). Schistosomiasis: challenges for control,
321 treatment and drug resistance. *Current Opinion in Infectious Diseases* **19**, 577-582.
- 322 **Harnett, W. and Kusel, J. R.** (1986). Increased exposure of parasite antigens at the
323 surface of adult male *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* **7**, 417-428.
- 324 **Horemans, A. M., Tiekens, A. G. and van den Bergh, S. G.** (1992). The reversible
325 effect of glucose on the energy metabolism of *Schistosoma mansoni* cercariae and
326 schistosomula. *Molecular and Biochemical Parasitology* **51**, 73-79.
- 327 **Ismail, M. M., Taha, S. A., Farghaly, A. M. and El-Azony, A. S.** (1994). Laboratory
328 induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. *Journal of the*
329 *Egyptian Society of Parasitology* **24**, 685-695.

- 330 **Kusel, J. K., Oliveira, F. A., Todd, M., Ronketti, F., Lima, S. F., Mattos, A. C. A.,**
331 **Reis, K. T., Coelho, P. M. Z., Thornhill, J. A. and Ribeiro, F. (2006).** The effects of
332 drugs, ions, and poly-lysine on the excretory system of *Schistosoma mansoni*. *Memórias*
333 *do Instituto Oswaldo Cruz* **101** (Suppl. 1), 293-298.
- 334 **Kusel, J. K., Al-Adhami, B. H. and Doenhoff, M. J. (2007).** The schistosome in the
335 mammalian host: understanding the mechanism of adaptation. *Parasitology* **134**, 1477-
336 1526.
- 337 **Liang, Y. S., Dai, J. R., Zhu, Y. C., Coles, G. C. and Doenhoff, M. J. (2003).** Genetic
338 analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. *The Southeast Asian*
339 *Journal of Tropical Medicine and Public Health* **34**, 274-280.
- 340 **Mattos, A. C., Pereira, G. C., Jannotti-Passos, L. K., Kusel, J. R. and Coelho, P. M.**
341 **(2007).** Evaluation of the effect of oxamniquine, praziquantel and a combination of both
342 drugs on the intramolluscan phase of *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica* **102**, 84-91.
- 343 **Mattos, A. C., Kusel, J. R., Pimenta, P. F. and Coelho, P. M. Z. (2006).** Activity of
344 praziquantel on *in vitro* transformed *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Memórias do*
345 *Instituto Oswaldo Cruz* **1** (Suppl.) S283-S287.
- 346 **Oliveira, F. A., Kusel, J. R., Ribeiro, F. and Coelho, P. M. Z. (2006).** Responses of
347 the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to
348 treatment with praziquantel and other biomolecules. *Parasitology* **132**, 321-330.
- 349 **Pax, R. A., Bennett, J. L. and Fetterer, R. (1978).** A benzodiazepine derivative and
350 praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma*
351 *japonicum*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **304**, 309-315.
- 352 **Pellegrino, J. and Katz, N. (1968).** Experimental chemotherapy of *Schistosoma*
353 *mansoni*. *Advances in Parasitology* **6**, 233-291.

- 354 **Pellegrino, J. and Siqueira, A. F.** (1956). Técnica de perfusão para colheita de
355 *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. *Revista Brasileira de*
356 *Malariologia* **8**, 589-597.
- 357 **Ribeiro, F., Coelho, P. M. Z., Vieira, L. Q., Watson, D. G. and Kusel, J. R.** (1998).
358 The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma*
359 *mansoni*. *Parasitology* **116**, 229-236.
- 360 **Riley, E. M. and Chappell, L. H.** (1990). Praziquantel treatment of *Biomphalaria*
361 *glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* - influence on snail fecundity.
362 *Parasitology* **101**, 211-217.
- 363 **Ross, M. H., Kwa, M. S. G., Veenstra, J. G., Kooyman, F. N. J. and Boersema, J.**
364 **H.** (1993). Molecular aspects of drug resistance in parasitic helminthes. *Pharmacology*
365 *& Therapeutics* **60**, 331-336.
- 366 **Smithers, S. R. and Terry, R. J.** (1965). The infection of laboratory hosts with
367 cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology*
368 **55**, 695-700.
- 369 **Souza, C. P., Jannotti-Passos, L. K. and Freitas, J. R.** (1995). Degree of host-parasite
370 compatibility between *Schistosoma mansoni* and their intermediate molluscan hosts in
371 Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **90**, 5-10.
- 372 **Tielens, A. G., Horemans, A. M., Dunnewijk, R., van der Meer, P. and van den**
373 **Bergh, S. G.** (1992). The facultative anaerobic energy metabolism of *Schistosoma*
374 *mansoni* sporocysts. *Molecular and Biochemical Parasitology* **56**, 49-57.
- 375 **Tielens, A. G., van de Pas, F. A., van den Heuvel, J. M. and van den Bergh, S. G.**
376 (1991). The aerobic energy metabolism of *Schistosoma mansoni* miracidia. *Molecular*
377 *and Biochemical Parasitology* **46**, 181-184.

- 378 **Touassem, R. and Combes, C.** (1986). Comparative analysis of the *Schistosoma*
379 *mansoni* and *Schistosoma bovis* production under influence praziquantel. *Zeitschrift für*
380 *Parasitenkunde* **72**, 345-351.
- 381 **Utzinger, J. and Keiser, J.** (2004). Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis:
382 common drugs for treatment and control. *Expert Opinion on Pharmacotherapy* **5**, 263-
383 285.
- 384 **Verjovski-Almeida, S., DeMarco, R., Martins, E. A. L., Guimarães, P. E. M., Ojopi,**
385 **E. P. B., Paquola, A. C. M., Piazza, J. P., Nishiyama Jr., M. Y., Kitajima, J. P.,**
386 **Adamson, R. E., Ashton, P. D., Bonaldo, M. F., Coulson, P. S., Dillon, G. P., Farias,**
387 **L. P., Gregorio, S. P., Ho, P. L., Leite, R. A., Malaquias, L. C. C., Marques, R. C.**
388 **P., Miyasato, P. A., Nascimento, A. L. T. O., Ohlweiler, F. P., Reis, E. M., Ribeiro,**
389 **M. A., Sá, R.G., Stukart, G. C., Soares, M. B., Gargioni, C., Kawano, T.,**
390 **Rodrigues, V., Madeira, A. M. B. N., Wilson, R. A., Menck, C. F. M., Setubal, J.**
391 **C., Leite, L. C. C. and Dias-Neto, E.** (2003). Transcriptome analysis of the
392 acelomate human parasite *Schistosoma mansoni*. *Nature Genetics* **35**, 148-157.
- 393 **Warren, K. S.** (1967). Studies on the treatment of molluscan schistosomiasis mansoni
394 with antibiotics, non-antibiotic, metabolic inhibitors, molluscicides and anti-
395 schistosomal agents. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and*
396 *Hygiene* **61**, 368-372.
- 397 **Warren, K. S. and Weisberger, A. S.** (1966). The treatment of molluscan
398 schistosomiasis mansoni with chloramphenicol. *American Journal of Tropical Medicine*
399 *and Hygiene* **15**, 342-350.
- 400 **World Health Organization.** (2002). *TDR Strategic Direction for Research:*
401 *Schistosomiasis*, World Health Organization, Geneva.
- 402

- 403 **Yi, X. M. and Combes, C.** (1987). Effect of praziquantel on larval stages of
404 *Schistosoma japonicum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and*
405 *Hygiene* **81**, 645-650.

For Peer Review

406 Table 1- Details of two experiments performed to estimate the percentage reduction of worm burden in
 407 mice infected with *Schistosoma mansoni* cercariae LE (susceptible) and LE-PZQ and treated with
 408 praziquantel

| <i>Isolate / experiment*</i> | <i>PZQ dose (mg/kg)</i> | <i>Mean of worm ± SD</i> | <i>Worm reduction (%)</i> |
|------------------------------|-------------------------|--|---------------------------|
| LE / 1 | 400, 800 | 0.42±0.79, 0.42±1.2 | 85.6, 85.6 |
| LE / 2 | 200, 400, 800 | 3.0±2.7, 0.6±1.2, 1.0±1.1 | 71.7, 94.3, 90.5 |
| LE-PZQ / 1 | 400, 800 | 1.9±1.4 ^a , 0.42±0.8 | 43.5, 87.6 |
| LE-PZQ / 2 | 200, 400, 800 | 9.7±5.8 ^b , 5.1±4.0 ^c , 1.16±1.5 | 8.8, 52.3, 89.2 |

409 * Mean of worms ± standard deviation: Exp. 1: LE Control: 2.92±2.93; LE-PZQ control: 3.4±3.1; Exp. 2: LE
 410 Control: 10.6±6.0; LE-PZQ Control: 10.7±6.4.

411 ^a statistical difference between LE-PZQ / 1 400 mg/kg and LE/1 400 mg/kg at p<0.01

412 ^b statistical difference between LE-PZQ / 2 200 mg/kg and LE/2 200 mg/kg at p<0.003

413 ^c statistical difference between LE-PZQ / 2 400 mg/kg and LE/2 400 mg/kg at p<0.01

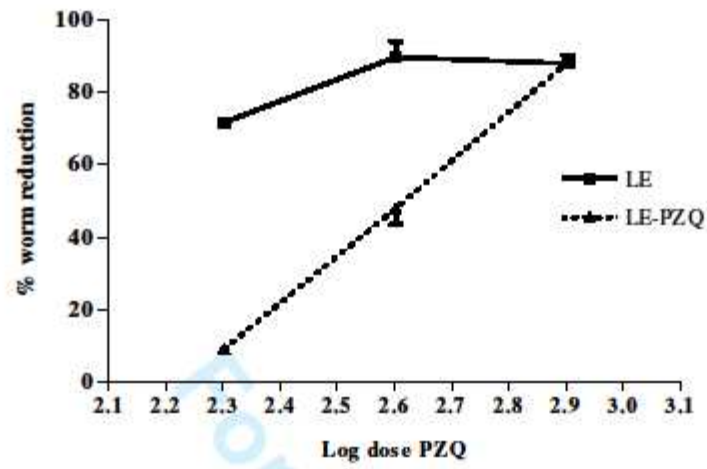
414 Table 2- Details of two experiments performed to estimate the PZQ ED₅₀ for the susceptible *S. mansoni*
 415 strain (LE) and that submitted to treatments with PZQ at the intramolluscan phase (LE-PZQ)

| <i>Isolate / PZQ dose</i> | <i>Mean of worm reduction (%) ± SD</i> | <i>ED₅₀</i> | <i>95% Confidence limits</i> |
|---------------------------|--|------------------------|------------------------------|
| LE 200 mg/kg | 71.1 | | |
| LE 400 mg/kg | 89.9±6.1 | 68 mg/kg | 38.49 to 121.1 |
| LE 800 mg/kg | 88.1±3.5 | | |
| LE-PZQ 200 mg/kg | 8.8 | | |
| LE-PZQ 400 mg/kg | 47.9±6.2 | 362 mg/kg ^a | 125.7 to 1044 |
| LE-PZQ 800 mg/kg | 88.4±1.3 | | |

416 ^a Mean of worm reduction related to experiment 1 and 2

417 ^b statistical difference between LE and LE-PZQ ED₅₀. LE-PZQ ED₅₀ (362 mg/kg) is 5.3 times higher than LE ED₅₀

418 (68 mg/kg). p<0.01.



419

420 Graph 1- Computer-adjusted PZQ dose-response curves for PZQ-susceptible (LE) and that isolate submitted to

421 intramuscular treatment with PZQ (LE-PZQ) of *S. mansoni*. The curves were fitted to the pooled results from two

422 experiments on each isolate listed in Table 2 using Prism (Graphpad 4) software.

423 CAPTIONS TO FIGURES

424 Fig. 1- Adult worms of LE (susceptible) and LE-PZQ (submitted to treatment with PZQ
425 at the intramolluscan phase) derived from mice treated with 400 mg/kg PZQ and
426 control, cultured for 8 days; (A) adult worm of the LE strain derived from mice treated
427 with 400 mg/kg PZQ, exhibiting intense muscular contraction; (B) adult worm of the
428 LE-PZQ isolate derived from mice treated with 400 mg/kg PZQ, absence of muscular
429 contraction; (C) dead eggs laid by worms of the LE strain treated with 400 mg/kg; (D)
430 large number of eggs in all stages laid by worms of the strain LE-PZQ treated with 400
431 mg/kg; (E) worm of the LE and (F) LE-PZQ isolates derived from untreated mice
432 (control), both have the same morphology after an 8-day-culture. In figures A, B, D, E
433 and F each bar represents 250 microns and in figure C the bar represents 100 microns.



Fig. 1- Adult worms of LE (susceptible) and LE-PZO (submitted to treatment with PZO at the intramolluscan phase) derived from mice treated with 400 mg/kg PZO and control, cultured for 8 days; (A) adult worm of the LE strain derived from mice treated with 400 mg/kg PZO, exhibiting intense muscular contraction; (B) adult worm of the LE-PZO isolate derived from mice treated with 400 mg/kg PZO, absence of muscular contraction; (C) dead eggs laid by worms of the LE strain treated with 400 mg/kg; (D) large number of eggs in all stages laid by worms of the strain LE-PZO treated with 400 mg/kg; (E) worm of the LE and (F) LE-PZO isolates derived from untreated mice (control), both have the same morphology after an 8-day-culture. In figures A, B, D, E and F each bar represents 250 microns and in figure C the bar represents 100 microns.
166x166mm (300 x 300 DPI)

5.2 Artigo 2

Couto FFB, Coelho PMZ, Araújo N, Katz N, Mattos ACA. Use of fluorescent probes as a useful tool to identify resistant *Schistosoma mansoni* isolates to praziquantel. Parasitol 2010; 137, 1–7.

Parasitology



Use of fluorescent probes as a useful tool to identify resistant *Schistosoma mansoni* isolates to praziquantel

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>Parasitology</i> |
| Manuscript ID: | PAR-2009-0509.R2 |
| Manuscript Type: | Research Article |
| Date Submitted by the Author: | 22-Mar-2010 |
| Complete List of Authors: | Couto, Flávia Fernanda; CPqRR/FIOCRUZ, Schistosomiasis Laboratory Coelho, Paulo Marcos; CPqRR/FIOCRUZ, Schistosomiasis Laboratory Araújo, Neusa; CPqRR/FIOCRUZ, Schistosomiasis Laboratory Kusel, John; University of Glasgow, Division of Infection and Immunity Katz, Naftale; CPqRR/FIOCRUZ, Schistosomiasis Laboratory Mattos, Ana Carolina; CPqRR/FIOCRUZ, Schistosomiasis Laboratory |
| Key Words: | <i>Schistosoma mansoni</i> , drug-resistance, praziquantel, fluorescent probes |



1 Use of fluorescent probes as a useful tool to identify resistant
2 *Schistosoma mansoni* isolates to praziquantel

3

4 F. F. B. COUTO¹, P. M. Z. COELHO^{1*}, N. ARAÚJO¹, J. R. KUSEL², N. KATZ¹ and
5 A. C. A. MATTOS^{1*}.

6

7 ¹Laboratório de Esquistossomose, Centro de Pesquisas René Rachou/Fiocruz, Belo
8 Horizonte, MG, Brasil

9 ²Division of Infection and Immunity, IBLS, University of Glasgow, Scotland, UK

10

11

12 **Running title: Fluorescent probes used to identify resistant *Schistosoma mansoni***
13 **to praziquantel**

14

15

16

17

18

19 * Corresponding authors: Tel: +55 31 3349 7740/ +55 31 3349 7759. Fax: +55 31 3295

20 3115. E-mail: coelhohp@cpqrr.fiocruz.br/ anademattos@cpqrr.fiocruz.br

21

22

23

24

25

26 S U M M A R Y

27 The use of chemotherapy on a mass scale in endemic areas may lead to the appearance
28 of resistant isolates through the mechanism of selective drug pressure. Studies have
29 demonstrated that praziquantel (PZQ) is able to inhibit the excretory activity and to
30 cause tegumental damage in *Schistosoma mansoni* adult worms. The use of the probe
31 resorufin to evaluate excretory activity, as well as the probe Hoechst 33258 to detect
32 tegumental damage in adult worms, may represent a method to identify resistant (or
33 less susceptible) isolates. The purpose of the present work was to compare the changes
34 caused by PZQ in the function of the excretory system and in the integrity of the
35 tegument of adult worms from the LE isolate (susceptible to PZQ) and the LE-PZQ
36 isolate (less susceptible to PZQ). Worms from the isolate LE-PZQ showed less severe
37 tegumental lesions, in both *in vitro* and *in vivo* experiments, detected by labeling with
38 Hoechst 33258 and continued to have a functional excretory system as shown by
39 labeling with resorufin *in vitro*.

40

41 Key words: *Schistosoma mansoni*, drug-resistance, praziquantel, fluorescent probes.

42

43

44

45

46

47

48

49

50

51 INTRODUCTION

52 Schistosomiasis is still a major health problem in many tropical and sub-tropical
53 countries. It is estimated that at the least 200 million people are currently infected with
54 schistosomiasis and another 600 million people are at risk of infection (WHO, 2002).
55 Currently, praziquantel (PZQ) is the drug of choice according to the World Health
56 Organization, being effective against all the five species of *Schistosoma* that infect
57 humans (Doenhoff *et al.* 2002). Although the mechanism of action of this drug against
58 *Schistosoma mansoni* is still not completely elucidated (Cioli and Picca-Matocchia,
59 2003), some of its effects on the parasite are well known, such as muscular contraction,
60 tegumental damage and metabolic changes (Pax *et al.* 1978; Fetterer *et al.* 1980; Becker
61 *et al.* 1980; Mehlhorn *et al.* 1981; Lima *et al.* 1994; Ribeiro *et al.* 1998; Oliveira *et al.*
62 2006; Kusel *et al.* 2006). The availability of a drug with low toxicity, oral single dose
63 and administration with high effectiveness, allows the large scale treatment of
64 populations. However, the use of large scale chemotherapy with successive treatments,
65 as the main method for the control of schistosomiasis in endemic areas, could result in
66 the appearance of resistant isolates, by means of selective drug pressure (Coelho *et al.*
67 1997).

68 It has been recently suggested that the excretory system of *Schistosoma* has an
69 important role in the parasite-host interaction and drug excretion. Sato *et al.* (2002,
70 2004) described the utilization of the fluorescent marker resorufin, a substrate for P-
71 glycoprotein (PgP), for evaluation of the excretory activity of *S. mansoni*. PgP is a
72 protein that exerts an important role in the absorption, elimination and distribution of
73 many xenobiotics, including a variety of drugs (Schinkel and Johker, 2003). Oliveira *et al.*
74 (2006), using resorufin, demonstrated that PZQ is able to inhibit the excretory
75 activity of *S. mansoni* adult worms (LE isolate, which is susceptible to PZQ), and this

76 activity can be restored when the worm is no longer in contact with the drug. Messerli *et*
77 *al.* (2009) point to higher levels of Pgp being associated with reduced susceptibility to
78 PZQ in *S. mansoni*.

79 The parasite-host interaction is extremely complicated, and the membrane surface is
80 an interface between the two organisms (Oliveira *et al.* 2006). The literature shows that
81 the *Schistosoma* tegument is an important target for antischistosomal drugs. William *et*
82 *al.* (2001) observed a decrease in the magnitude of the damage caused by PZQ to the
83 tegument of PZQ resistant adult worms, when compared with the tegument of
84 susceptible adult worms. Moreover, Oliveira *et al.* (2006) demonstrated that PZQ is
85 able to cause damage to the tegument of susceptible adult worms, using the probe
86 Hoechst 33258 (bisbenzimidazole), a hydrophilic probe, which becomes fluorescent only
87 when it binds to the DNA after diffusing into sub-tegumental cells where there are
88 tegumental lesions, thus acting as an indicator of membrane integrity.

89 The evaluation of the presence of tegumental damage and excretory activity in adult
90 worms, after exposure to PZQ, using specific fluorescent markers, would be a novel
91 method for identification of resistant *S. mansoni* isolates. In this work we have
92 compared, using fluorescence microscopy, the changes caused by PZQ to the excretory
93 system and to the tegument of adult normal (LE) worms with those less susceptible to
94 PZQ (isolate LE-PZQ which was produced by use of drug pressure on infected
95 *Biomphalaria glabrata* (Couto *et al.* to be submitted). This isolate LE-PZQ was termed
96 resistant in accordance with the concept of resistance suggested by Coles and Kinoti
97 (1997), *i.e.* "a population of *Schistosoma* is resistant when either a susceptible
98 population shows a significant decrease in its response to a schistosomicide or it is
99 significantly less sensitive than a fully susceptible population".

100

101 MATERIALS AND METHODS

102 *Life cycle of the parasite and infection of animals*

103 Swiss mice were infected subcutaneously with 100 *S. mansoni* cercariae (LE or LE-
104 PZQ isolates). The LE isolate had been maintained for more than 50 years at the Centro
105 de Pesquisas René Rachou (CPqRR) / FIOCRUZ (Pellegrino and Katz, 1968). The
106 cercariae LE-PZQ were from a *S. mansoni* isolate submitted to treatments with PZQ at
107 the intramolluscan stage. This isolate was obtained when infected *Biomphalaria*
108 *glabrata* snails were submitted to three treatments with PZQ, each treatment
109 administered on 5 consecutive days, with 1 week interval, for selection of less
110 susceptible parasites to PZQ. The isolate LE-PZQ was passaged through mice and
111 treated 45 days after infection with 400mg/kg PZQ. It was observed that 52,3% of
112 worms were recovered alive, whereas in the isolate without chemotherapeutical pressure
113 (control) only 10% of worms were recovered alive. (Couto *et al.* to be submitted). These
114 values for worm recovery suggest that LE-PZQ isolate is resistant (Coles and Kinoti,
115 1997).

116 *In vitro and in vivo experiments*

117 Mice infected with LE or LE-PZQ cercariae, were perfused 45 days after infection,
118 according to the technique described by Smithers and Terry (1965), using culture
119 medium RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) with 0.2% of heparin
120 as perfusate. Four worm pairs were distributed into each well of tissue culture plates
121 containing six wells (six well plates). The worms of the LE and LE-PZQ isolates were
122 put into separate wells. The methodologies for evaluation of the excretory system
123 activity and tegumental damage have been previously described (Oliveira *et al.* 2006).
124 Photographic records were taken with a digital camera (Canon EOS Digital Rebel XT).

125

126 *Evaluation of the excretory system activity of adult worms LE and LE-PZQ with*
127 *resorufin and incubation with PZQ in vitro*

128 The worms were maintained for 30 minutes in 4 mL of culture medium RPMI with an
129 additional 5% of foetal bovine serum (FBS – Gibco Limited, Paisley, Scotland, U.K)
130 and 100µg/ml of antibiotics penicillin/streptomycin (Sigma). Afterwards, 10µL of
131 resorufin (Sigma – stored solution 10 mg/mL in medium) were added to each well, and
132 incubated in 5% of CO₂ at 37° C, for 30 minutes. After being washed 5 times with 2 ml
133 of RPMI to remove the excess probe, 2 µg/mL of PZQ (Cestox® – Merck) were added
134 to the wells containing worms (LE-PZQ or LE isolates), incubated in 5% of CO₂, at 37°
135 C, for 15 minutes. The worms were once again washed 5 times with culture medium
136 and transferred to slides within a square demarcated with vaseline to avoid overflow of
137 the worms and medium. They were then observed under fluorescence microscope (Karl
138 Zeiss Axiostar Plus filter for Rhodamine - excitation/maximal emission of resorufin
139 571/585 nm). Where there is significant accumulation of resorufin into the excretory
140 tubules, the resorufin appears bright red or yellow on a fainter red background.

141

142 *Evaluation of tegumental damage in LE and LE-PZQ adult worms after incubation with*
143 *PZQ in vitro, using the probe Hoechst 33258*

144 The worms were maintained in 2 mL of culture medium RPMI with addition of 5% FBS
145 and 100µg/ml of antibiotics penicillin/streptomycin. Afterwards, 2 µg/mL PZQ were
146 added and the worms incubated in 5% CO₂, at 37° C, for 1 hour. They were washed 5
147 times with 1 mL culture medium to remove the drug. Then, 10 µL of the probe Hoechst
148 33258 (Sigma – stored aqueous solution 10 mg/mL) were added, and the worms were
149 incubated in 5% CO₂, at 37° C, for 15 minutes. The worms were washed 5 times with
150 culture medium, and transferred to slides demarcated with vaseline before observation

151 under the fluorescence microscope (Karl Zeiss Axiostar Plus filter for DAPI –
152 excitation/maximal emission of Hoechst 33258 352/455 nm).

153

154 *Evaluation of tegumental damage in LE and LE-PZQ adult worms, after treatment with*
155 *PZQ in vivo, using the probe Hoechst 33258*

156 Mice infected with LE or LE-PZQ cercariae, were treated 45 days post-infection with
157 400 mg/kg PZQ. After 2 hours, mice were perfused according to the technique
158 described by Smithers and Terry (1965), using culture medium RPMI-1640 with 0.2%
159 of heparin. Four pairs of worms were placed into each well of six well culture plates.
160 The worms of the LE and LE-PZQ isolates were put into separate wells with 2 mL of
161 culture medium RPMI with addition of 5% FBS and 100µg/ml of antibiotics
162 penicillin/streptomycin. Then, 10 µL of the probe Hoechst 33258 were added, and the
163 worms were incubated in 5% CO₂, at 37° C, for 15 minutes. The worms were washed 5
164 times with culture medium, and transferred to slides demarcated with vaseline before
165 observation under the fluorescence microscope (Karl Zeiss Axiostar Plus filter for DAPI
166 – excitation/maximal emission of Hoechst 33258 352/455 nm).

167

168 RESULTS

169 *Labeling of the excretory system of adult worms (LE and LE-PZQ) with resorufin and*
170 *incubation with PZQ*

171 Due to the variability of results in female worms, we chose to evaluate only the
172 excretory activity of males. The adult male worms derived from LE and LE-PZQ
173 cercariae, exposed to resorufin *in vitro* showed their excretory system brightly labeled
174 by the probe with yellow or bright red fluorescence (fig. 1 A and B; fig. 1 E and F,
175 respectively. After PZQ treatment, in each well, the majority of the male worms of the

176 LE isolate showed a complete inhibition with 2µg/mL PZQ (fig. 1 C and D) whereas
177 very few (25%) of the isolate LE-PZQ showed inhibition. Thus, it was observed that the
178 majority of the LE-PZQ worms exposed to resorufin and incubated with PZQ *in vitro*,
179 showed some fluorescence in the excretory system although with less intensity of
180 fluorescence in comparison with the worms not exposed to PZQ (fig. 1 G and H). This
181 result indicates a reduction in the susceptibility of the worms LE-PZQ to PZQ.

182

183 *Evaluation of the tegumental damage of adult worms after exposure to PZQ in vitro and*
184 *in vivo using the probe Hoechst 33258*

185 The fluorescent regions indicate tegumental damage. The worms derived from the LE
186 (fig. 2 A and B; fig. 3 A and B) and LE-PZQ isolates (fig. 2 E and F; fig. 3 E and F) that
187 were not exposed to the drug *in vitro* or *in vivo* did not show tegumental damage. In
188 each well, the majority of the male and female worms of the LE isolate, exposed to 2
189 µg/mL *in vitro* or worms obtained from mice 2 hours after administration of PZQ
190 (single oral dose of 400mg/kg) showed intense damage in the tegument (Fig. 2 C; fig. 3
191 C and D) but very few (25%) of the LE-PZQ worms showed tegumental damage. Thus,
192 in each well, the majority of the LE-PZQ male and female worms presented
193 significantly less intense damage in their teguments in comparison with the LE worms
194 (Fig. 2 G and H; Fig. 3 G and H). These results corroborate the findings concerning the
195 excretory activity, indicating a reduction in the susceptibility of the LE-PZQ to PZQ.

196

197 DISCUSSION

198 In the experiments examining the changes caused by PZQ in the excretory system of *S.*
199 *mansoni*, our findings corroborate the results obtained by Oliveira *et al.* (2006),
200 showing that PZQ was able to inhibit the excretory activity of *S. mansoni* adult worms

201 (susceptible LE isolate). Compared to the parasites of the LE isolate, PZQ was not able
202 to inhibit completely the excretory activity of the worms from the LE-PZQ isolate.
203 After PZQ treatment of these resistant worms, (LE-PZQ isolate) it was possible to
204 observe a clear labeling with the probe resorufin, although less intense than that
205 observed in the untreated control. The control LE-PZQ parasites show accumulation of
206 resorufin into the excretory ducts as a yellow (fig. 1 E) or bright red (fig. 1 F)
207 fluorescence on a red background. After treatment with PZQ there is some bright red
208 fluorescence detectable in the parasite (arrowed and put in a box for clarity). As
209 described by Sato *et al.* (2002), we chose to work only with male parasites, due to
210 variation in the responses of females to resorufin. Resorufin is a putative substrate of
211 PgP. The SMDR2, a PgP homologue, has already been described in *S. mansoni* by
212 Bosch *et al.* (1994). These PgP, as well as the proteins associated with the resistance to
213 multi-drugs (MRP), are ABC carriers (ATP – Binding Cassete) and are associated with
214 resistance phenotype to drugs, as well as frequently expressed drug resistant tumour
215 cells, with the function to reduce cytotoxicity of drugs in the cytoplasm of those cells
216 (Kusel *et al.* 2006). In this way, the super-expression of these homologous PgPs with *S.*
217 *mansoni* may be responsible for the resistance of this parasite to the drug. Messerli *et al.*
218 (2009) obtained results indicating that high levels of SMDR2 may be associated with
219 the reduced susceptibility to PgP in *S. mansoni*.

220 We can assert as an hypothesis that the labeling of the excretory system of LE-PZQ
221 worms, even after exposure to the drug *in vitro*, demonstrates the continued excretory
222 activity of the worm. If PZQ is excreted through the excretory system of the
223 schistosome, the possible resistance mechanism would be related to a rapid excretion of
224 PZQ in LE-PZQ isolate, thus impairing its lethal activity on the parasite. PZQ might be
225 more damaging to the LE isolate worms, if their excretory activity was inhibited by the

226 drug. We suggest that PgP or homologous proteins present in the epithelium of the
227 excretory system have an important role in the elimination of various drugs. This
228 suggestion is in accordance with Schinkel *et al.* (2003).

229 It is well known that PZQ is able to cause intense damage to the surface of the adult
230 worm (Becker *et al.* 1980; Mehlhorn *et al.* 1981; Oliveira *et al.* 2006). The damage
231 generated by PZQ causes either the immediate death of the parasite, or could lead to the
232 exposure of antigens, which after recognition by the specific immune response, would
233 consequently eliminate the parasite (Harnett and Kusel, 1986; Doenhoff *et al.* 1987;
234 Modha *et al.* 1990). The magnitude of the tegumental lesions of adult worms has been
235 already suggested as a possible parameter to differentiate susceptible and resistant
236 isolates to PZQ (William *et al.* 2001).

237 A sensitive tool for identification of tegumental lesions in *S. mansoni* is the
238 fluorescent probe Hoechst 33258 (Oliveira *et al.* 2006). This probe has already been
239 used in various studies, not only in adult worms (Lima *et al.* 1994; Oliveira *et al.* 2006),
240 but also in schistosomulum (Kusel *et al.* 2007), sporocyst (Mattos *et al.* 2006), and
241 cercariae (Thornhill *et al.* 2009). The probe Hoechst 33258, which binds DNA of cells,
242 is a very sensitive indicator of membrane integrity, since even the worms of the LE
243 and LE-PZQ isolates – not exposed to PZQ *in vitro* or *in vivo* – showed slight labeling
244 with the probe, leading to some variability among the groups. These small labeled
245 regions, observed in the worms of the control group, are a consequence of the method
246 used for worm recovery (Oliveira *et al.* 2006). However, the well-marked labeling by
247 Hoechst 33258 in worms of the LE isolate exposed to PZQ *in vitro* and *in vivo* is very
248 clear, confirming the capacity of PZQ to cause tegumental damage in *S. mansoni* worms
249 of the control group (susceptible to PZQ). However, in worms of the LE-PZQ isolate
250 exposed to the drug *in vitro* and *in vivo*, only small fluorescent regions could be

251 observed. According to William *et al.* (2001), the worms that are less susceptible to the
252 effects of PZQ on the tegument *in vivo*, are also less susceptible to the same effects of
253 the drug *in vitro*. Ismail *et al.* (1996) also demonstrated that worms resistant to the
254 effects of PZQ *in vivo* showed a significant reduction in the responses of PZQ *in vitro*.

255 In conclusion, we have shown that resistant adult worms (produced from *S.mansoni*
256 infected *B.glabrata* snails subjected to PZQ drug pressure) exhibit less tegumental
257 damage and less inhibition of the excretory system than normal parasites. Further work
258 on cercariae and other larval stages of normal and resistant isolates would be valuable.

259

260 ACKNOWLEDGEMENTS

261

262 To Vera de Paula Ribeiro for translation from Portuguese; to the technicians of the
263 Mollusc Room, at the Centro de Pesquisa René-Rachou-Fiocruz, for providing the
264 parasites; to CNPq and CAPES for financial support.

265

266 REFERENCES

267

268 **Becker, B., Mehlhorn, H., Andrews, P., Thomas, H. and Eckert, J.** (1980). Light and
269 electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*,
270 *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica* (Trematoda) *in vitro*. *Zeitschrift für*
271 *Parasitenkunde* **63**, 113-128.

272 **Bosch, I. B., Wang, Z. X., Tao, L. C. S. and Schoemaker, C. B.** (1994). Two
273 *Schistosoma mansoni* cDNA encoding ATP-binding cassette (ABC) family proteins.
274 *Molecular and Biochemical Parasitology* **65**, 351 – 356.

- 275 **Cioli, D. and Pica-Mattoccia, L.** (2003). Praziquantel. *Parasitology Research* **90**,
276 (Suppl.) S3-S9.
- 277 **Coelho, P. M. Z., Lima, F. C. S. and Nogueira, J. A. M.** (1997). Resistance to
278 oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* strain isolate from a patient submitted to
279 repeated treatments. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* **39**, 101-
280 106.
- 281 **Coles, G.C. and Kinoti, G.K.** (1997). Defining resistance in *Schistosoma*. *Parasitology*
282 *Today* **13**, 157-158.
- 283 **Couto, F. F. B., Araújo, N., Janotti-Passos, L. K., Katz, N., Coelho, P. M. Z. and**
284 **Mattos, A. C. A.** Method for inducing resistance to praziquantel using *Biomphalaria*
285 *glabrata* snails infected with *Schistosoma mansoni*. (To be submitted).
- 286 **Doenhoff, M. J., Kusel J. R., Coles G. C. and Cioli D.** (2002). Resistance of
287 *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Transactions of the Royal*
288 *Society of Tropical Medicine and Hygiene* **96**, 465-469.
- 289 **Doenhoff, M. J., Sabah, A. A., Fletcher, C., Webbe, G. and Bain, J.** (1987).
290 Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in
291 mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **81**, 947-951.
- 292 **Fetterer, R. H., Pax, R. A. and Bennett, J. L.** (1980). Praziquantel, potassium and 2,4-
293 dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*.
294 *European Journal of Pharmacology* **64**, 31-8.
- 295 **Harnett, W. and Kusel, J. R.** (1986). Increased exposure of parasite antigens at the
296 surface of adult male *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunology* **7**, 417-428.
- 297 **Ismail, M., Metwally, A., Farghaly, A., Bruce, J., Tao, L. F. and Bennett, J. L.**
298 (1996). Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers

- 299 that tolerate high dose of praziquantel. *The American Journal of Tropical Medicine and*
300 *Hygiene* **55**, 214 – 218.
- 301 **Kusel, J. K., Al-Adhami, B. H. and Doenhoff, M. J.** (2007). The schistosome in the
302 mammalian host: understanding the mechanism of adaptation. *Parasitology*, 1-50.
- 303 **Kusel, J. R., Oliveira, F. A., Todd, M., Ronketti, F., Lima, S. F., Mattos, A. C. A.,**
304 **Reis, K. T., Coelho, P. M. Z., Thornhill, J. A. and Ribeiro, F.** (2006). The effects of
305 drugs, ions, and poly-L-lysine on the excretory system of *Schistosoma mansoni*.
306 *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **1** (Suppl.) S293-S298.
- 307 **Lima, S. F., Vieira, L. Q., Harder, A. and Kusel, J. R.** (1994). Altered behavior of
308 carbohydrate- bound molecules and lipids in areas of the tegument of adult *Schistosoma*
309 *mansoni* worms damage by praziquantel. *Parasitology* **109** 469 – 477.
- 310 **Mattos, A. C., Kusel, J. R., Pimenta, P. F. and Coelho, P. M. Z.** (2006). Activity of
311 praziquantel on *in vitro* transformed *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Memórias do*
312 *Instituto Oswaldo Cruz* **1** (Suppl.) S283-S287.
- 313 **Mehlhorn, H., Becker, B., Andrews, P., Thomas, H. and Frenkel, J. K.** (1981). *In*
314 *vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*.
315 *Arzneimittelforschung* **31**, 544 – 554.
- 316 **Messerli, S. M., Kasinathan, R. S., Morgan, W., Spranger, S. and Greenberg, R.**
317 **M.** (2009). *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to
318 praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility. *Molecular*
319 *and Biochemical Parasitology* **167**, 54-59.
- 320 **Modha, J., Lambertucci, J. R., Doenhoff, M. J. and McLaren, D. J.** (1990). Immune
321 dependence of schistosomicidal chemotherapy: an ultrastructural study of *Schistosoma*
322 *mansoni* adult worms exposed to praziquantel and immune serum *in vivo*. *Parasite*
323 *Immunology* **12**, 321-334.

- 324 **Oliveira, F. A., Kusel, J. R., Ribeiro, F. and Coelho, P. M. Z.** (2006). Responses of
325 the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to
326 treatment with praziquantel and other biomolecules. *Parasitology* **132**, 321-330.
- 327 **Pax, R. A., Bennett, J. L. and Fetterer, R.** (1978). A benzodiazepine derivative and
328 praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma*
329 *japonicum*. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **304**, 309 – 315.
- 330 **Pellegrino, J. and Katz, N.** (1968). Experimental chemotherapy of *Schistosoma*
331 *mansoni*. *Advances in Parasitology* **6**, 233-291.
- 332 **Ribeiro, F, Coelho, P. M. Z., Vieira, L. Q., Watson, D. G. and Kusel, J. R.** (1998).
333 The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma*
334 *mansoni*. *Parasitology* **116** 229-236.
- 335 **Sato, H., Kusel, J. R. and Thornhill, J. A.** (2002). Functional visualization of the
336 excretory system of adult *Schistosoma mansoni* by the fluorescent marker resorufin.
337 *Parasitology* **125**, 527-535.
- 338 **Sato, H., Kusel, J. R. and Thornhill, J. A.** (2004). Excretion of fluorescent substrates
339 of mammalian multidrug resistance associated protein (MRP) in the *Schistosoma*
340 *mansoni* excretory system. *Parasitology* **128**, 43-52.
- 341 **Schinkel, A. H. and Jonker, J. W.** (2003). Mammalian drug efflux transporters of the
342 ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Advanced Drug Delivery Reviews* **55**,
343 3 – 29.
- 344 **Smithers, S. R. and Terry, R. J.** (1965). The infection of laboratory hosts with
345 cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology*
346 **55**, 695-700.
- 347 **Thornhill, J. R., Kusel, J. R., Oliveira, F. A., Ribeiro, F., Lima, S. F., Coelho, P.**
348 **M. Z., Meveigh, P. and Mattos, A. C. A.** (2009). The uptake of macromolecules by

349 cercarie durin skin penetration and during *in vitro* transformation to schistosomula
350 (*Schistosoma mansoni*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* (in press).

351 **William, S., Botros, S., Ismail, M., Farghally, A., Day, T. A. and Bennett, J. L.**
352 (2001). Praziquantel-induced tegumental damage *in vitro* is diminished in schistosomes
353 derived from praziquantel-resistant infections. *Parasitology* **1**, 63-66.

354 **World Health Organization.** (2002). *TDR Strategic Direction for Research:*
355 *Schistosomiasis*, World Health Organization, Geneva.

356

357 CAPTIONS TO FIGURES

358

359 Fig. 1 – *In vitro* evaluation of the effect of PZQ on the excretory system of *S. mansoni*
360 adult worms. (A) and (B) *S. mansoni* LE labeled with the probe resorufin and not
361 exposed to PZQ. (C) and (D) *S. mansoni* LE labeled with the probe resorufin and
362 exposed to 2µg/mL PZQ. (E) and (F) *S. mansoni* LE-PZQ labeled with the probe
363 resorufin and not exposed to PZQ. (G) and (H) *S. mansoni* LE-PZQ labeled with the
364 probe resorufin and exposed to 2µg/mL PZQ. Arrow: main tubule and ramifications of
365 the excretory system. Each bar represents 100 micron. In G, H labeled regions of the
366 excretory system are shown in a box as well as an arrow.

367

368 Fig. 2 – *In vitro* evaluation of the effect of PZQ on the tegument of *S. mansoni* adult
369 worms. (A) and (B) *S. mansoni* LE not exposed to PZQ and labeled with the probe
370 Hoechst 33258. (C) and (D) *S. mansoni* LE exposed to 2µg/mL PZQ and labeled with
371 the probe Hoechst 33258. (E) and (F) *S. mansoni* LE-PZQ not exposed to PZQ and
372 labeled with the probe Hoechst 33258. (G) and (H) *S. mansoni* LE-PZQ exposed to

373 2µg/mL PZQ and labeled with the probe Hoechst 33258. The fluorescent areas indicate
374 intense lesions. Each bar represents 100 micron.

375

376 Fig. 3 – The tegument of *S. mansoni* adult worms observed *in vivo* (A) and (B) *S.*
377 *mansoni* LE not treated with PZQ and labeled with the probe Hoechst 33258. (C) and
378 (D) *S. mansoni* LE treated with 400 mg/Kg PZQ and labeled with the probe Hoechst
379 33258 of PZQ. (E) and (F) *S. mansoni* LE-PZQ not treated with PZQ and labeled with
380 the probe Hoechst 33258. (G) and (H) *S. mansoni* LE-PZQ treated with 400 mg/Kg and
381 labeled with the probe Hoechst 33258. The fluorescent areas indicate intense lesions.
382 Each bar represents 100 micron.

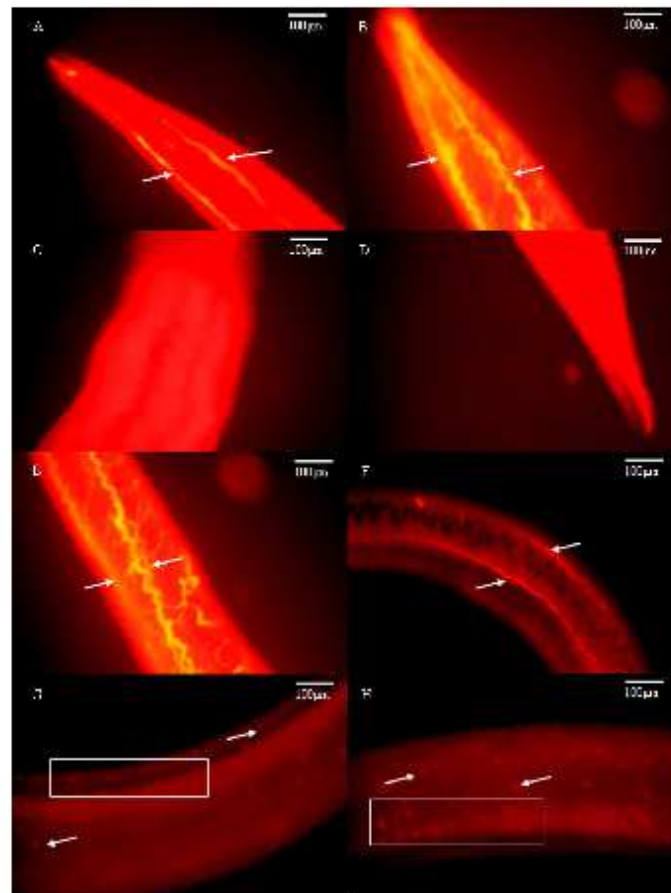
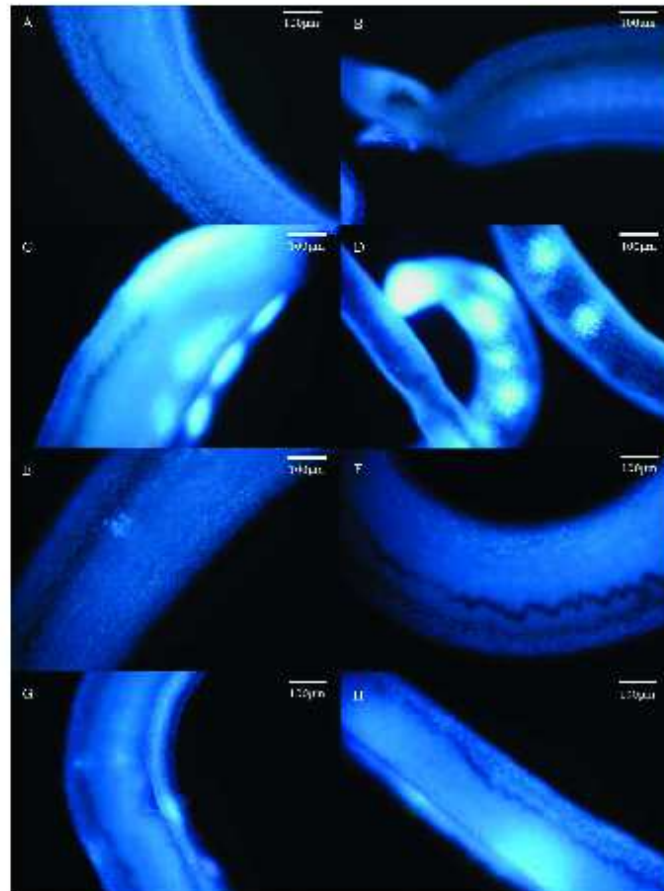


Fig. 1 – *In vitro* evaluation of the effect of PZQ on the excretory system of *S. mansoni* adult worms. (A) and (B) *S. mansoni* LE labeled with the probe resorufin and not exposed to PZQ. (C) and (D) *S. mansoni* LE labeled with the probe resorufin and exposed to 2 μ g/mL PZQ. (E) and (F) *S. mansoni* LE-PZQ labeled with the probe resorufin and not exposed to PZQ. (G) and (H) *S. mansoni* LE-PZQ labeled with the probe resorufin and exposed to 2 μ g/mL PZQ. Arrow: main tubule and ramifications of the excretory system. Each bar represents 100 micron. In G, H labeled regions of the excretory system are shown in a box as well as an arrow.
166x219mm (300 x 300 DPI)



In vitro evaluation of the effect of PZQ on the tegument of *S. mansoni* adult worms. (A) and (B) *S. mansoni* LE not exposed to PZQ and labeled with the probe Hoechst 33258. (C) and (D) *S. mansoni* LE exposed to 2µg/mL PZQ and labeled with the probe Hoechst 33258. (E) and (F) *S. mansoni* LE-PZQ not exposed to PZQ and labeled with the probe Hoechst 33258. (G) and (H) *S. mansoni* LE-PZQ exposed to 2µg/mL PZQ and labeled with the probe Hoechst 33258. The fluorescent areas indicate intense lesions. Each bar represents 100 micron.
166x223mm (300 x 300 DPI)

CONSIDERAÇÕES FINAIS

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A esquistossomose é uma das doenças parasitárias de maior prevalência no mundo e está associada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico, o que gera a necessidade de utilização de águas naturais contaminadas para o exercício da agricultura, trabalho doméstico e/ou lazer. Afeta mais de 200 milhões de pessoas em zonas rurais e periurbanas, entre as quais 120 milhões são sintomáticas e 20 milhões sofrem conseqüências graves da doença. No Brasil, estima-se mais de 8 milhões de pessoas infectadas, enquanto outras 30 milhões estão sob o risco de contrair a doença. Tem como agente etiológico o *Schistosoma mansoni*, trematódeo de ciclo heteroxênico, que têm mamíferos, incluindo o homem, como hospedeiros definitivos e espécies de caramujos de água doce do gênero *Biomphalaria* como hospedeiros intermediários.

O praziquantel (PZQ) é, atualmente, o medicamento de escolha para o tratamento da esquistossomose. Apresenta baixa toxicidade, é administrado oralmente, em dose única e com alta eficácia, possibilitando o tratamento da população em larga escala. Em função da eficiência e segurança, foi possível o emprego em larga escala em áreas endêmicas, bem como em tratamentos repetidos. Porém, o uso regular de drogas para o controle de parasitas pode levar à seleção de cepas resistentes, através do mecanismo de pressão seletiva. A existência de cepas de *Schistosoma* resistentes ao PZQ pode ser considerada um problema para o controle dessa doença, uma vez que os métodos de controle da esquistossomose têm na quimioterapia um de seus principais procedimentos.

A manutenção de uma cepa resistente ao PZQ em laboratório é de grande importância, pois possibilita desenvolver diversos estudos em relação aos mecanismos de resistência ao medicamento, aos mecanismos de ação da droga no parasito, bem como identificar marcadores moleculares para identificação de resistência ao PZQ em campo. Além disso, permite testar novos esquemas terapêuticos para serem utilizados quando forem detectados casos de resistência. Porém, os diversos experimentos de indução de resistência, realizados em laboratório, utilizando sucessivas passagens e tratamentos em camundongos são longos e utilizam metodologias distintas, o que dificulta a comparação entre eles, impedindo, assim, uma análise mais aprofundada dos resultados obtidos. Deste modo, os principais problemas para o estudo da resistência do *S. mansoni* ao PZQ se devem às dificuldades de execução dos métodos tradicionais de indução e à manutenção do isolado em laboratório. Atualmente, não se tem relato da existência de um isolado resistente, desenvolvido em laboratório, que venha sendo mantido em condições laboratoriais.

Estudos já demonstraram a ação do PZQ em diversas fases do *S. mansoni*, inclusive na fase intramolusco. Desta forma, a possibilidade de seleção de isolados resistentes, em laboratório, utilizando *S. mansoni* na fase intramolusco, seria de grande valia, uma vez que seria um processo mais fácil, rápido e econômico do que o método clássico por passagens em camundongos. Neste caso, a pressão é exercida sobre milhares de formas evolutivas, as cercárias (pressão sobre um número muitíssimo maior de organismos do que no modelo com camundongo, em vermes adultos), abreviando o processo seletivo.

O presente trabalho teve como objetivo principal selecionar um isolado de *S. mansoni* resistente ao PZQ utilizando pressão quimioterápica em *B. glabrata* infectada com o parasito. No primeiro artigo resultante da dissertação, “Method for inducing resistance to praziquantel using *Biomphalaria glabrata* snails infected with *Schistosoma mansoni*” descrevemos o método utilizado para indução de resistência. A metodologia e os resultados obtidos foram descritos e submetidos a publicação na revista *Parasitology*. O isolado resistente selecionado, denominado LE-PZQ, apresentou uma ED₅₀ (dose efetiva para matar 50% dos vermes) 5,3x maior que na cepa controle, suscetível ao PZQ. Este procedimento demonstrou ser um método rápido, fácil e eficiente para seleção de isolados resistentes ao PZQ.

O sistema excretor do *Schistosoma* tem recebido, nos últimos anos, atenção especial devido ao seu importante papel na interação parasito-hospedeiro. Estudos utilizando uma sonda fluorescente, a resorufim, demonstraram que o PZQ é capaz de inibir a atividade excretora de vermes adultos sensíveis ao medicamento. Esta sonda é um substrato da Pgp, uma proteína que está associada fenótipos de resistência à fármacos. Já foram descritos homólogos a essa proteína no *S. mansoni*.

O PZQ é também capaz de causar intensos danos na superfície de vermes adultos que causam a morte direta do parasito ou levam a exposição de antígenos que, juntamente com o medicamento, eliminariam o verme. A sonda Hoechst 33258 é uma sonda hidrofílica, capaz de se ligar ao DNA das células atuando como indicador de integridade de membrana e já foi utilizada em estudos com vermes adultos, esquistossômulos, cercárias e esporocistos.

Diante do exposto, tivemos, também, como objetivo avaliar a atividade excretora e a magnitude dos danos causado no tegumento de vermes após exposição ao PZQ. A metodologia utilizada e os resultados foram descritos no outro artigo resultante desta dissertação: “Use of fluorescent probes as a useful tool to identify resistant *Schistosoma mansoni* isolates to praziquantel”. Foi possível concluir que o PZQ não inibe completamente a atividade do sistema excretor de vermes adultos *in vitro*, recuperados de camundongos infectados com cercárias LE-PZQ, já que a marcação deste sistema pela sonda resorufim não desaparece completamente após adição do fármaco conforme ocorre em vermes da linhagem

LE controle. E também que os vermes adultos provenientes de camundongos infectados com cercárias LE-PZQ apresentaram danos no tegumento menos intensos do que em vermes de camundongos infectados com cercárias da cepa LE padrão, após exposição ao PZQ *in vivo* ou *in vitro*.

Os resultados obtidos com a utilização das sondas fluorescentes resorufim e Hoechst 33258 corroboram com os resultados para avaliação da resistência do isolado submetido à pressão quimioterápica na fase intramolusco. A partir de então, será possível manter o isolado resistente sob pressão quimioterápica afim de que o mesmo continue resistente e será possível realizar, em grande escala, experimentos que visem de esclarecer os mecanismos envolvidos na resistência do parasito ao PZQ.

7 ANEXO

7.1 Aceite da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – FIOCRUZ)



MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
VICE-PRESIDÊNCIA DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2008

CARTA Nº 038-08/CEUA-FIOCRUZ

Dr. Paulo Marcos Zech Coelho
Pesquisador
CPqRR

Referência: Protocolo P-0340/07

Prezado Dr. Paulo Marcos,

Temos o prazer de informar-lhe que seu projeto intitulado **"Uso do praziquantal em Biomphalaria glabrata infectadas com Schistosoma mansoni visando seleção de linhagens resistentes e iden"**, foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ).

O certificado de licença é encaminhado em anexo (L-0014/08).

Obrigado por submeter seu projeto a CEUA-FIOCRUZ.

Respeitosamente,



Octavio Augusto França Presgrave

Coordenador da CEUA
FIOCRUZ

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Al-Adhami BH, Noble C, Sharaf O, Thornhill J, Doenhoff MJ, Kusel R. The role of acidic organelles in the development of schistosomula of *Schistosoma mansoni* and their response to signalling molecules. *Parasitol* 2005; 130(3): 309-22.

Al-Adhami BH, Thornhill J, Akhka A, Doenhoff MJ, Kusel JR. The properties of acidic compartments in developing schistosomula of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol* 2003; 127(3): 253-64.

Andrews P. Effect of praziquantel on the free-living stages of *Schistosoma mansoni*. *Z Parasitenkunde* 1978; 56: 99-06.

Araújo NP, Souza SP, Passos LKJ, Simpson AJG, Dias Neto E, Pereira TR, Cerutti JRC, Alencar FEC, Dietze R, Katz N. Suscetibilidade aos agentes quimioterápicos de isolados de *Schistosoma mansoni* oriundos de pacientes tratados com oxamniquina e praziquantel e não curados. *Rev Soc Bras Med Trop* 1996; 29: 467 – 76.

Bassily S, Farid Z, Dunn M, El-Masry NA, Stek MJR. Praziquantel for treatment of schistosomiasis in patients with advanced splenomegaly. *Am J Trop Med Hyg* 1985; 79: 629–34.

Becker B, Mehlhorn H, Andrews P, Thomas H, Eckert J. Light and electron microscopic studies on the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica* (Trematoda) *in vitro*. *Z Parasitenkd* 1980; 63: 113-28.

Bennett JL, Day T, Feng-Tao L, Ismail M, Farghaly A. The development of resistance to anthelmintics: a perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. *Exp Parasitol* 1997; 87: 260-7.

Bonesso-Sabadini PIP, Dias LCS. Altered response of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97 (3): 381 – 5.

Bosch IB, Wang ZX, Tao LCS, Schoemaker CB. Two *Schistosoma mansoni* cDNA encoding ATP-binding cassette (ABC) family proteins. *Mol Biochem Parasitol* 1994; 65: 351 – 6.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2008. 178 p. Brochura, 26 cm, il, color. (Série

A: Normas e Manuais Técnicos). ISBN 978-52-334-1438-9. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_controle_moluscos.pdf. Acesso 15 dez. 2009. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>

Campos R, Moreira AAB, Sette Jr H, Chamone DAF, da Silva LC. Hycanthone resistance in a human strain of *Schistosoma mansoni*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1976; 70: 261-2.

Carneiro-Santos P, Thornhill JÁ, Doenhoff MJ, Hagan P, Kusel JR. Acidic vesicles of *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res 2001; 87(12): 1001-6.

Cioli D, Botros SS, Francklow KW, Mbaye A, Southgate V, Tchuente TLA, Pica-Mattoccia L, Troiani AR, Seif el Din SH, Sabra AA, Albin J, Engels D, Doenhoff MJ. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. Int J Parasitol 2004; 34: 979 – 87.

Cioli D, Pica-Mattoccia L, Archer S. Antischistosomal drugs: past, present and future. Pharmacol Ther 1995; 68 (1): 35-85.

Cioli D, Pica-Mattoccia L. Praziquantel. Parasitol Res 2003; 90 (Suppl 1): S3-9.

Coelho PMZ, Katz N, Rocha MO, Souza CP, Mello RT. *Schistosoma mansoni*: infected snails as a tool to screen antischistosomal drugs. Inter Parasitol 1988; 18 (2): 167-70.

Coelho PMZ, Lima FCS, Nogueira JAM. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* strain isolate from a patient submitted to repeated treatments. Rev Inst Med Trop São Paulo 1997; 39: 101-6.

Coles CG. The metabolism of Schistosomes: a review. Int J Biochem 1973; 4: 319 – 37.

Coles GC. The effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. J Helminthol 1979; 53: 31-3.

Coles GC. The molecular biology of drug resistance in parasitic helminths. Comp Biochem of Paras Helm 1989; 125-44.

Coles GC, Bruce JI. In vitro selection of drug resistant *Schistosoma mansoni*. Int J Parasitol 1987; 17(3): 767-71.

Coura JR, Amaral RS. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. Mem Inst Oswaldo Cruz 2004; 99 Suppl 1: 13-9.

Day TA, Bennett JL, Pax RA. Praziquantel: the enigmatic antiparasitic. *Parasitol Today* 1992; 8: 342 – 4.

Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008 Dec; 21(6): 659-67.

Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2002; 96: 465-9.

Doenhoff MJ, Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Bain J. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 947-51.

El-Ansary A, Al-Daihan S. Important aspects of *Biomphalaria* snail-schistosome interactions as targets for antischistosome drug. *Med Sci Monit* 2006; 12(12): 282-92.

Engels D, Chitsulo L, Montresor A, Savioli L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop* 2002; 82 :139-46.

Fallon PG, Doenhoff MJ. Drug resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 51 (1): 83 – 8.

Fallon PG, Sturrock RF, Capron A, Niang M, Doenhoff MJ. Short report: Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53 (1): 61 – 2.

Fallon PG, Tao LF, Ismail MM, Bennett JL. Schistosome resistance to praziquantel: Fact or Artifact? *Parasitol Today* 1996; 12(8): 316-20.

Fenwick A, Savioli L, Engels D, Robert Bergquist N, Todd MH. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol* 2003; 19(11): 509-15.

Fetterer RH, Pax RA, Bennett JL. Praziquantel, potassium and 2,4-dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*. *Eur J Pharmacol* 1980; 64(1): 31- 8.

Gonnert R, Andrews P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Z Parasitenkd* 1977; 52: 129 – 50.

Greenberg RM. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? *Int J Parasitol* 2005; 35: 1–9.

Gryseels B, Mbaye A, De Vlas SJ, Stelma FF, Guisse F, Van Lieshout L, Faye D, Diop M, Ly A, Tchuem Tchuenté LA, Engels D, Polman K. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. *Trop Med Int Health* 2001; 6: 864–73.

Harnett W, Kusel JR. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni*. *Parasite Immunol* 1986; 7: 417–28.

Ismail M, Botros S, Metwally A, William S, Farghally A, Tao LF, Day TA, Bennett JL. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 60 (6): 932 – 5.

Ismail M, Metwally A, Farghaly A, Bruce J, Tao LF, Bennett JL. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high dose of praziquantel. *Am J Trop Med Hyg* 1996; 55 (2): 214 – 8.

James CE, Hudson AL, Davey MW. Drug resistance mechanisms in helminths: is it survival of the fittest? *Trends Parasitol* 2009; 25: 328–35.

Johnston LA, Yoshino TP. Analysis of lectin- and snail plasma-binding glycopeptides associated with the tegumental surface of the primary sporocysts of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol* 1996; 112 (Pt 5): 469–79.

Katz N, Dias EP, Araújo N, Souza CP. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. *Rev Soc Bras Med Trop* 1973; 7 (6): 381 – 7

Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2000; 33 (3): 303–8.

Kinoti GK, Coles GC. Defining resistance in *Schistosoma*. *Parasitol Today* 1997; 13: 157–8.

Kusel JK, Al-Adhami BH, Doenhoff MJ. The schistosome in the mammalian host: understanding the mechanism of adaptation. *Parasitol* 2007; 134: 1477–526.

Kusel JK, Oliveira FA, Todd M, Ronketti F, Lima SF, Mattos ACA, Rreis KT, Coelho PMZ, Thornhill JÁ, Ribeiro F. The effects of drugs, ions, and poly-lysine on the excretory system of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 101 Suppl. 1: 293–8.

Lage, H. ABC-transporters: implications on drug resistance from microorganisms to human cancers. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22: 188– 99.

Liang YS, Coles GC, Doenhoff MJ, Southgate VR. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *Int J Parasitol* 2001; 31(11): 1227-35.

Liang YS, Coles GC, Doenhoff MJ. Detection of praziquantel resistance in schistosomes. *Trop Med Int Health* 2000; 5(1): 72.

Liang YS, Dai JR, Zhu YC, Coles GC, Doenhoff MJ. Genetic analysis of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* 2003; 34 (2): 274-80.

Lima SF, Vieira LQ, Harder A, Kusel JR. Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitol* 1994a; 109: 57 – 64.

Mattos AC, Pereira GC, Jannotti-Passos LK, Kusel JR, Coelho PM. Evaluation of the effect of oxamniquine, praziquantel and a combination of both drugs on the intramolluscan phase of *Schistosoma mansoni*. *Acta Trop* 2007; 102(2): 84-91.

Mattos, A. C., Kusel, J. R., Pimenta, P. F. and Coelho, P. M. Z. Activity of praziquantel on *in vitro* transformed *Schistosoma mansoni* sporocysts. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2006; 1 Suppl: S283-S87.

Mehlhorn H, Becker B, Andrews P, Thomas H, Frenkel JK. *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. *Arzneimittelforschung* 1981; 31: 544 – 54.

Meister A & Anderson ME. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 1983; 52: 711 – 760.

Messerli SM, Kasinathan RS, Morgan W, Spranger S, Greenberg RM. *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel susceptibility. *Mol Biochem Parasitol* 2009; 167: 54-9.

Modha J, Lambertucci JR, Doenhoff MJ, McLaren DJ. Immune dependence of schistosomicidal chemotherapy: an ultrastructural study of *Schistosoma mansoni* adult worms exposed to praziquantel and immune serum *in vivo*. *Parasite Immunol* 1990; 12: 321-34.

Oliveira FA, Kusel JR, Ribeiro F, Coelho PMZ. Responses of the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to treatment with praziquantel and other biomolecules. *Parasitol* 2006; 132: 321-30.

Oliveira FA. Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação destas drogas sobre o verme adulto de *Schistosoma mansoni*. Orientador: Dr. Paulo Marcos Zech Coelho, Co-orientador: Dr. John Robert Kusel. Belo Horizonte: s.n, 2005. 82 p. il. Dissertação(Mestrado em Ciências da Saúde - Doenças Infecciosas e Parasitárias)-Ministério da Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisas René Rachou. Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Disponível em: http://www.cpqrr.fiocruz.br/texto-completo/D_39.pdf . Acesso em: 15 dez. 2009. Biblioteca de Ciências da Saúde Prof. Zigman Brener <http://netra.cpqrr.fiocruz.br/phl82/index.html>

Paraense WL. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. *Arq Mus Nac* 1975. 55: 105-28.

Pax RA, Bennett JL, Fetterer R. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1978; 304: 309 – 15.

Pellegrino J, Katz N. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni*. *Adv Parasitol* 1968; 6: 233-91.

Pellegrino J, Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infestadas. *Rev Bras Malariol Doenças Trop* 1956; 8: 589 – 97.

Pica-Mattoccia L, Cioli D. Sex and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. *Int J Parasitol* 2004; 34: 527-533.

Pica-Mattoccia L, Valle C, Basso A, Troiani AR, Vigorosi F, Liberti P, *et al.* Cytochalasin D abolishes the schistosomicidal activity of praziquantel. *Exp Parasitol* 2007; 115:344–51.

Redman CA, Robertson A, Fallon PJ, Modha J, Kusel JR, Doenhoff MJ, Martin RJ. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. *Parasitol Today* 1996; 12(1): 14-20.

Ribeiro F, Coelho PMZ, Vieira LQ, Watson DG, Kusel JR. The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. *Parasitol* 1998; 116: 229-36.

Riley EM, Chappell LH. Praziquantel treatment of *Biomphalaria glabrata* infected with *Schistosoma mansoni* - influence on snail fecundity. *Parasitol* 1990; 101: 211-17

Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Doenhoff MJ. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. *Exp Parasitol* 1986; 61: 294 – 303.

Sato H, Kusel JR, Thornhill J. Excretion of fluorescent substrates of mammalian multidrug resistance-associated protein (MRP) in the *Schistosoma mansoni* excretory system. *Parasitol* 2004; 128, 43–52.

Sato H, Kusel JR, Thornhill J. Functional visualization of the excretory system of adult *Schistosoma mansoni* by the fluorescent marker resorufim. *Parasitol* 2002; 125: 527 – 35.

Schinkel AH, Jonker JW. Mammalian drug efflux transporters of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55(1): 3 – 29.

Smithers SR, Terry RJ. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitol* 1965, 55: 695-00.

Souza CP. *Schistosoma mansoni*: aspectos quantitativos da interação hospedeiro-parasito e desenvolvimento em *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*. [Tese de Doutorado]. Minas Gerais: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais; 1993.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J. Schistosomiasis and water resource development: systematic review, meta analysis, and estimates of people risk. *Lancet Inf Dis* 2006; 6(7): 411-25.

Stelma FF, Talla A, Sow S, Kongs A, Nang M, Polman K, Delder AM, Gryseels B. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg* 1995; 53 (2): 167-70.

Teles HM. Geographic distribution of *Schistosoma mansoni* transmitter snail species in State of São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop* 2005; 38(5): 426-32.

Thornhill JR, Kusel JR, Oliveira FA, Ribeiro F, Lima SF, Coelho PMZ, Meveigh P, Mattos ACA. The uptake of macromolecules by cercariae during skin penetration and during *in vitro* transformation to schistosomula (*Schistosoma mansoni*). *Mem Inst Oswaldo Cruz* In press 2010.

Touassem R, Combes C. Comparative analysis of the *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma bovis* production under influence praziquantel. *Z Parasitenkunde* 1986; 72 (3): 345-51.

Uchikawa R, Loker ES. Lectin-binding properties of the surfaces of *in vitro*-transformed *Schistosoma mansoni* and *Echinostoma paraensei* sporocysts. *J Parasitol* 1991; 77(5): 742-8.

Van der Werf MJ, de Vlas SJ, Brooker S, Looman CW, Nagelkerke NJ, Habbema JD, Engels D. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Trop* 2003; 86(2-3): 125-39.

Warren KS, Weisberger AS. The treatment of molluscan schistosomiasis mansoni with chloramphenicol. *Am J Trop Med Hyg* 1966; 15 (3): 342- 50.

Warren KS. The immunopathogenesis of schistosomiasis: a multidisciplinary approach. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1972; 64: 432.

Warren, KS. Studies on the treatment of molluscan schistosomiasis mansoni with antibiotics, non-antibiotic, metabolic inhibitors, molluscicides and anti-schistosomal agents. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1967; 61(3): 368-72.

William S, Botros S, Ismail M, Farghally A, Day TA, Bennett JL. Praziquantel-induced tegumental damage in vitro is diminished in schistosomes derived from praziquantel-resistant infections. *Parasitol* 2001; 22 Pt 1:63-6.

Wolde Mussie E, Vande Waa J, Pax RA, Fetterer R, Bennett JL. *Schistosoma mansoni*: calcium efflux and effects of calcium-free media on responses of the adult male musculature to praziquantel and other agents inducing contraction. *Exp Parasitol* 1982; 53(2): 270-8.

World Health Organization. Prevention and control of schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 2002; 912 (i-vi): 1-57.

World Health Organization. The control of schistosomiasis. Second report of WHO expert committee. Geneva: World Health Organization; 1993. WHO Technical Report Series, No. 830.

Wu MH, Wei CC, Xu ZY, Yuan HC, Lian WN, Yang QJ, Chen M, Jiang QW, Wang CZ, Zhang SJ. Comparison of the therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levopraziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of schistosomiasis japonica. *Am J Trop Med Hyg* 1991; 45: 345– 9.

Xiao SH, Catto BA, Webster LT. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* *in vitro* and *in vivo*. J Infect Dis 1985; 151: 1130 – 37.

Xiao SH, Catto BA. Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of racemic praziquantel and its levorotated isomer on *Schistosoma mansoni*. J Infect Dis 1989; 159: 589 – 92.

Xiao SH, Friedman PA, Catto BA, Webster LT Jr. Praziquantel-induced vesicle formation in the tegument of male *Schistosoma mansoni* is calcium dependent. J Parasitol 1984; 70(1): 177-9.

Yi XM, Combes C. Effect of praziquantel on larval stages of *Schistosoma japonicum*. Trans R Soc Trop Med Hyg 1987; 81(4): 645-50.

Yoshino TP, Cheng TC, Renwranz LR. Lectin and human blood group determinants of *Schistosoma mansoni*: alteration following *in vitro* transformation of miracidium to mother sporocyst. J Parasitol 1977; 63(5): 818-24.

Zelck U, Becker W. Lectin binding to cells of *Schistosoma mansoni* sporocysts and surrounding *Biomphalaria glabrata* tissue. J Invertebr Pathol 1990; 55(1): 93-9.