

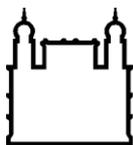
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado *Stricto sensu* em Medicina Tropical

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA RESPOSTA TERAPÊUTICA E  
PROFILÁTICA DE PRAZIQUANTEL EM DUAS FORMULAÇÕES  
FARMACÊUTICAS À INFECÇÃO ESQUISTOSSOMÓTICA**

ÉRICA TEX PAULINO

Rio de Janeiro  
Janeiro de 2019



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

*Érica Tex Paulino*

AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA RESPOSTA TERAPÊUTICA E PROFILÁTICA DE  
PRAZIQUANTEL EM DUAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS À INFECÇÃO  
ESQUISTOSSOMÓTICA

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo  
Cruz como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Medicina Tropical

**Orientador (es):** Prof. Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto  
Prof. Dr. Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa

**RIO DE JANEIRO**

Janeiro de 2019

Paulino, Érica Tex.

Avaliação experimental da resposta terapêutica e profilática de praziquantel em duas formulações farmacêuticas à infecção esquistossomótica / Érica Tex Paulino. - Rio de Janeiro, 2019.

xv, 44f f.; il.

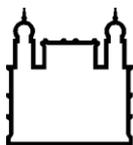
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2019.

Orientador: Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto.

Co-orientadora: Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa.

Bibliografia: f. 32-43

1. Esquistossomose. 2. Praziquantel. 3. *Schistosoma mansoni*. 4. Nanoencapsulado. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical**

***AUTORA: ÉRICA TEX PAULINO***

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA RESPOSTA TERAPÊUTICA E PROFILÁTICA  
DE PRAZQUANTEL EM DUAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS À  
INFECÇÃO ESQUISTOSSOMÓTICA**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto  
Prof. Dr. Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa**

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Martha Cecília Suarez Mutis - Presidente** (Laboratório de Doenças Parasitárias – IOC/FIOCRUZ-RJ)

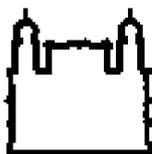
**Prof. Dr. Jacenir Reis dos Santos Mallet** (Laboratório Interdisciplinar de Vigilância Entomológica em Diptera e Hemiptera – IOC/FIOCRUZ-RJ)

**Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva** (Instituto de Biologia / Departamento de Ciências Fisiológicas – UFRRJ)

**Prof. Dr. Eduardo José Lopes Torres** (Faculdade de Ciências Médicas – UERJ)

**Prof. Dr. Marcio Neves Bóia** (Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios – IOC/FIOCRUZ-RJ)

Rio de Janeiro, 30 de Janeiro de 2019



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz

## DECLARAÇÃO

Declaramos, para fins curriculares, que **Érica Tex Paulino**, sob orientação do Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto e Dr<sup>a</sup>. Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa, foi aprovada em 30/01/2019, em sua defesa de dissertação de mestrado intitulada: **“Avaliação da resposta teraêutica e profilática de *Schistosoma mansoni* ao praziquantel em duas formulações farmacêuticas”**, área de concentração: Diagnóstico, Epidemiologia e Controle. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr<sup>a</sup>. Martha Cecilia Suárez Mutis - IOC/FIOCRUZ (presidente), Dr. Jairo Pinheiro da Silva - UFRRJ/RJ, Dr. Eduardo José Lopes Torres - UERJ/RJ e como suplentes: Dr<sup>a</sup>. Jacenir Reis dos Santos Mallet - IOC/FIOCRUZ e Dr. Marcio Neves Boia - IOC/FIOCRUZ.

A Pós-graduação *Stricto sensu* em Medicina Tropical (Mestrado e Doutorado) está credenciada pela CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, de acordo com Portaria nº. 1740, de 20.12.94, do Ministro de Estado da Educação e do Desporto, e com a Portaria nº. 840, de 22.12.94, tendo validade no Brasil para todos os efeitos legais, e alcançando conceito 6 (seis) na última avaliação trienal da CAPES.

Informamos ainda que, de acordo com as normas do Programa de Pós-graduação, **a liberação do Diploma e do Histórico Escolar está condicionada à entrega da versão definitiva da dissertação/tese em capa espiral (1 cópia), juntamente com o termo de autorização de divulgação da dissertação/tese on line e o CD-rom com a dissertação completa em PDF.**

Rio de Janeiro, 30 de janeiro de 2019.

Martha Cecilia Suárez Mutis  
Matrícula-STAPE 1556044

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical  
Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz

Documento registrado sob nº DCE-9725/18 no livro nº II, folha 54v em 30/01/2019.

Aos meus pais, minha avó, meus irmãos  
e orientadores pelo apoio e incentivo ao  
meu crescimento profissional.

v

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Aos meus orientadores, meus “pais científicos”, Dra. Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa e Dr. Antonio Henrique Almeida de Moraes Neto que não pouparam esforços para me dar apoio, tranquilidade e incentivo contínuo na condução do meu trabalho. Sou e serei grata eternamente pela oportunidade, confiança e carinho que sempre tiveram comigo.

Aos meus pais, meus irmãos e minha avó por todo amor, carinho e dedicação. Obrigada pela paciência em todos os momentos e pelo incentivo constante. Amo muito vocês!

Às equipes do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ e do Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos – IOC/FIOCRUZ, pelo apoio, conversas, conselhos e momentos de descontração. Em especial ao Valdir, Jéssica, Vanessa por me ajudarem em vários momentos com a realização e leitura de lâminas do meu experimento, e à Morgana e Viviane não só pelo auxílio valioso em meus experimentos, mas também pela grande amizade cultivada entre nós. Todos vocês foram essenciais nessa trajetória!

Aos integrantes da banca examinadora, por aceitarem nosso convite e pela dedicação do seu tempo à avaliação deste trabalho, em especial à Dra. Jacenir Reis dos Santos Mallet, pelas considerações durante sua revisão.

Aos meus amigos queridos, do programa de Medicina Tropical, o apoio de vocês nessa jornada foi essencial para que a trajetória até a defesa fosse mais branda e divertida. Vou agradecer sempre por ter vocês em minha vida!

Ao Sr. Paulo e toda a equipe do Laboratório de Malacologia do Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ pelo auxílio em ceder as cercárias necessárias para a infecção dos meus camundongos, quando os nossos caramujos não queriam colaborar.

Ao Sr. Claudio do Laboratório de Esquistossomose Experimental pela simpatia e carinho em tão pouco tempo de contato. Sua expertise em algumas técnicas parasitológicas foi de grande importância para o desenvolvimento do meu trabalho.

À Monique, veterinária do Biotério do Pavilhão Lauro Travassos e uma amiga querida, muitíssimo obrigada por todo o suporte nos meus experimentos. Desde a execução de procedimentos como a coleta de sangue dos camundongos até conselhos importantíssimos sobre a condução do projeto, seu auxílio foi de vital importância nessa minha trajetória acadêmica.

Ao Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos (ICTB/ FIOCRUZ), em especial ao Dr. Cléber Hooper, que sempre se empenhou em me auxiliar a fazer os exames.

À Dra Alessandra Lifitch Viçosa, do Laboratório de Farmacotécnica Experimental – Farmanguinhos/FIOCRUZ e ao Dr Claudio Salomon, da Universidad de Rosario – Argentina, por cederem as formulações de Praziquantel utilizados no meu experimento.

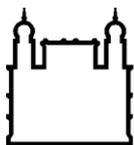
Aos docentes e membros da coordenação do programa de pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz, pelo auxílio oferecido aos discentes, em especial à Dra. Martha Suárez-Mutis, pelo cuidado, carinho e incentivo a cada um dos seus alunos.

Ao Instituto Oswaldo Cruz, o qual tive o prazer de fazer parte durante os últimos anos, por toda a infraestrutura disponível para a realização deste estudo.

Ao CNPq e à Fiocruz, pelo apoio financeiro oferecido a mim durante o desenvolvimento deste projeto.

“De modo geral, não é a observação de fenômenos raros e escondidos que só são apresentáveis por meio de experimentos que serve para a descoberta das mais importantes verdades, mas a observação daqueles fenômenos que são evidentes e acessíveis a todos. Por isso a tarefa não é ver o que ninguém viu ainda, mas pensar aquilo que ninguém pensou a respeito daquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DA RESPOSTA TERAPÊUTICA E PROFILÁTICA DE PRAZIQUANTEL EM DUAS FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS AO *Schistosoma mansoni* SAMBON, 1907**

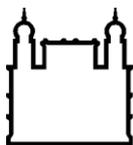
#### **RESUMO**

#### **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL**

**Érica Tex Paulino**

A esquistossomose é uma parasitose de ampla distribuição e considerada uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas do mundo. O praziquantel é, atualmente, o único medicamento preconizado pela OMS para o tratamento da esquistossomose mansônica. Neste contexto, testes com novas formulações do praziquantel ou até mesmo novos fármacos tornam-se relevantes para o controle da doença. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da formulação nanoencapsulada contendo Praziquantel na infecção esquistossomótica. Foram determinados seis grupos experimentais: dois grupos de camundongos Swiss albinos infectados com *Schistosoma mansoni* e tratados com as formulações de Praziquantel nanoencapsulado e livre separadamente (N=40 cada); dois grupos com animais não infectados e tratados com as duas formulações separadamente (N=30) e seus respectivos controles sem infecção e sem tratamento (N=20) e com infecção e sem tratamento (N=30). Com a finalidade de avaliar o tratamento em diferentes fases do desenvolvimento do parasito, o grupo dos infectados e tratados foi dividido em três subgrupos (15, 30 e 60 dias). Em todos os grupos foram avaliados os resultados das enzimas hepáticas (ALT, AST, fosfatase alcalina) e proteínas totais. A dinâmica parasitária foi avaliada em 60 e 90 dias após a infecção. Os resultados obtidos constataram que o praziquantel na dose e formulação utilizadas não surtiu o efeito esperado no tratamento da infecção esquistossomótica, pois não ocorreu a diminuição da carga parasitária após o tratamento no período patente, pelo contrário, a carga parasitária aumentou em 144,8%. Em relação ao tratamento no período pré-patente da infecção, não verificamos diferenças na quantidade de ovos por grama de fezes entre os grupos observados, no entanto ambas as formulações (PZQ-L – praziquantel “puro” e PZQ-N – praziquantel nanoencapsulado) em comparação ao controle reduziram o número de ovos em 15 e 30 dias, 70,1% e 67,2% (PZQ-L), enquanto que o PZQ-N reduziu nos mesmos períodos 26,5% e 11,4%, respectivamente. Comparando a eficácia de tratamento das formulações neste período, observou-se que o grupo tratado com PZQ-L eliminou 59% e 63% (15 e 30 dias) menos ovos. Nenhum dos níveis de enzimas hepáticas em nenhum dos grupos avaliados ficou fora do intervalo de referência do teste laboratorial. Apenas os grupos infectados (IN-15, IN-30 e IN-60) apresentaram valores acima do intervalo de referência nos parâmetros avaliados. Conclui-se que a formulação nanoencapsulada do praziquantel deste estudo não foi eficaz no tratamento da esquistossomose mansônica, pois não reduziu a carga parasitária na fase patente da infecção. O presente trabalho gerou informações relevantes sobre a necessidade de novos fármacos para o tratamento da esquistossomose mansônica.

Palavras-chave: esquistossomose, praziquantel, *Schistosoma mansoni*, nanoencapsulado



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE THERAPEUTIC AND PROFILATIC RESPONSE OF *Schistosoma mansoni* TO PRAZIQUANTEL IN TWO PHARMACEUTICAL FORMULATIONS

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Érica Tex Paulino

Schistosomiasis is a widely distributed parasite and is considered one of the most important neglected tropical diseases in the world. Praziquantel is currently the only drug used by the WHO for the treatment of schistosomiasis mansoni. In this context, tests with new formulations of praziquantel or even new drugs have made it relevant to disease control. The aim of this study was to evaluate the effect of the nanoencapsulated formulation containing Praziquantel on schistosomal infection. Six experimental groups were determined: two groups of albino Swiss mice infected with *Schistosoma mansoni* and treated with the nanoencapsulated and free formulations separately (N = 40 each); two groups with uninfected animals and treated with the two formulations separately (N = 30) and their respective controls without infection and without treatment (N = 20) and with infection and without treatment (N = 30). In order to evaluate the treatment in different phases of the parasite cycle, the infected and treated groups were divided into three subgroups (15, 30 and 60 days). In all groups the results of liver enzymes (ALT, AST, alkaline phosphatase and total proteins) were evaluated. The parasitic dynamics were evaluated at 60 and 90 days after infection. The results obtained showed that praziquantel in the dose and formulation used did not have the expected effect in the treatment of the schistosomiasis infection, as it did not occur the reduction of the parasite load after the treatment in the patent period, on the contrary, the parasitic load increased in 144.8%. Regarding treatment in the pre-patent period of infection, we did not observe differences in the amount of eggs per gram of feces among the groups observed, however both formulations (PZQ-L and PZQ-N) in comparison to the control reduced the number of eggs in 15 and 30 days, 70.1% and 67.2% (PZQ-L), while the PZQ-N reduced in the same periods 26.5% and 11.4%, respectively. Comparing the treatment efficacy of the formulations in this period, it was observed that the group treated with PZQ-L eliminated 59% and 63% (15 and 30 days) fewer eggs. None of the liver enzyme levels in any of the evaluated groups was outside the reference range of the laboratory test. Only the infected groups (IN-15, IN-30 and IN-60) presented values above the reference range in the evaluated parameters. The present work generated relevant information about the need for new drugs for the treatment of schistosomiasis mansoni.

Key words: schistosomiasis, praziquantel, *Schistosoma mansoni*, nanoencapsulated

# ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>IX</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>X</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1 Esquistossomose mansônica .....	1
1.2 Praziquantel .....	7
1.3 Nanoencapsulamento .....	11
1.4 Justificativa .....	12
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
2.1 Objetivo Geral .....	14
2.2 Objetivos Específicos .....	14
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>15</b>
3.1 Delineamento do estudo .....	15
3.2 Modelo Animal e Parasitos .....	15
3.3 Fármacos e dose utilizada .....	16
3.4 Determinação dos grupos experimentais .....	17
3.5 Coleta de sangue e parâmetros bioquímicos analisados .....	18
3.6 Dinâmica parasitária .....	18
3.7 Análise estatística dos dados .....	19
3.8 Considerações Éticas .....	19
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>21</b>
4.1 Análise do efeito do tratamento com ambas as formulações de Praziquantel na quantidade de ovos por grama de fezes dos camundongos (OPG) e da carga parasitária. ....	21
4.2 Análise do efeito do tratamento com ambas as formulações nos resultados sorológicos das enzimas hepáticas em diferentes períodos. ....	23
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>26</b>
<b>6 PERSPECTIVAS</b>	<b>30</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>31</b>

<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>32</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>44</b>
<b>9.1</b>	<b>Licença CEUA L-016/2015 aprovada .....</b>	<b>44</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição da Esquistossomose no Mundo, de acordo com informações do ano de 2015 da Organização Mundial de Saúde (Adaptado). ....	5
Figura 2. Faixa de positividade (%) da Esquistossomose no Brasil, no período de 2010 2015.....	6
Figura 3. Fórmula estrutural do Praziquantel e seus Enantiômeros. ....	8
Figura 4. Principais nanoestruturas utilizadas no nanoencapsulamento.....	11
Figura 5. Níveis séricos de enzimas hepáticas, em camundongos que receberam apenas tratamento com PZQ-N ou PZQ-L, estratificados pelo tipo de tratamento e pelo tempo após a administração do medicamento.....	24
Figura 6 - Níveis séricos de enzimas hepáticas, em camundongos que receberam apenas tratamento com PZQ-N ou PZQ-L ou foram infectados sem tratamento posterior, estratificados pelo tipo de tratamento e pelo tempo após a administração do medicamento ou após a infecção .....	25

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1. Quantidade média de ovos por grama de fezes (OPG) de camundongos no período patente da infecção esquistossomótica (60 dias após a infecção) antes e 30 dias após o tratamento com praziquantel nanoencapsulado (PZQ-N) e praziquantel livre (PZQ-L).....22**

**Tabela 2. Quantidade média de ovos por grama de fezes (OPG) de camundongos, recolhidos 60 dias após a infecção e tratados com praziquantel nanoencapsulado (PZQ-N) e praziquantel livre (PZQ-L) no período pré-patente da infecção esquistossomótica. ....23**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDC	Do inglês “Centers for Disease Control and Prevention” (Centro de Controle e Prevenção de Doenças);
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais;
g/dL	Grama por decilitro;
IAMAT	International Association for Medical Assistance to Travellers
ICTB	Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos;
IN-PZQ-L	Grupo formado por animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> , porém não receberam tratamento com Praziquantel livre;
IN-PZQ-N	Grupo formado por animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> , porém não receberam tratamento com Praziquantel nanoencapsulado;
INTR-PZQ-L	Grupo formado por animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados posteriormente com Praziquantel livre;
INTR-PZQ-N	Grupo formado por animais infectados por <i>Schistosoma mansoni</i> e tratados posteriormente com Praziquantel nanoencapsulado;
LE	Cepa de <i>Schistosoma mansoni</i> , linhagem susceptível ao praziquantel;
mg/kg	Miligramas por quilo;
OMS	Organização Mundial da Saúde;
OPG	Ovos por grama;
PVA	Polímero poli álcool vinílico, utilizado como estabilizante de nanopartículas.
PZQ	Praziquantel;
PZQ-N	Praziquantel nanoencapsulado;
rpm	Rotações por minuto;
TR-PZQ-L	Grupo formado por animais livres de infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> que receberam tratamento com Praziquantel livre;
TR-PZQ-N	Grupo formado por animais livres de infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> que receberam tratamento com Praziquantel nanoencapsulado;
U/L	Unidades por litro;
WHA	Do inglês “World Health Assembly” (Assembléia Mundial da Saúde);
WHO	Do inglês “World Health Organization” (Organização Mundial da Saúde).

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Esquistossomose mansônica

A esquistossomose é considerada pela OMS como uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas (Colley et al. 2014), por afetar mais de 240 milhões de pessoas no mundo (King et al. 2005; Steinmann et al. 2006; CDC, 2018) e ter um desenvolvimento crônico, causando uma morbidade debilitante (Berquist et al. 2005).

Existem cinco espécies descritas de importância epidemiológica humana que causam a esquistossomose no mundo: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*, *Schistosoma intercalatum* e *Schistosoma mekongi* (Inobaya et al. 2014). Essa doença é endêmica em 78 países localizados na América, África, Oriente Médio e Ásia, estima-se que aproximadamente 200 a 260 milhões de pessoas estão infectadas no mundo (WHO 2018). No entanto se adicionarmos a este número os indivíduos em estágio de pós infecção que permanecem com a morbidade residual teríamos um total de, aproximadamente, 440 milhões de pessoas afetadas (COLLEY et al. 2014). O continente africano é o mais acometido apresentando altas taxas de endemicidade em 42 dos seus países (Figura 1) (INOBYA et al. 2014). Em termos de faixa etária, observa-se que crianças e adolescentes infectam-se mais frequentemente. A prevalência em grupos de indivíduos com idade entre 10-19 anos aproxima-se de 100%, em algumas áreas endêmicas. Apresenta leve predominância pelo sexo masculino, talvez com provável associação deste gênero ao uso de recursos hidrográficos contaminados para atividades econômicas ou de lazer. No entanto, representa risco especialmente para saúde da mulher em países onde o *S. haematobium* é o agente etiológico, pois este está associado ao surgimento de lesões genitais em 30% das mulheres infectadas.

A introdução da doença no continente americano está associada ao tráfico de escravos e aos fluxos migratórios oriundos principalmente do continente africano (Carvalho et al 2008). No Brasil, a maior prevalência foi diagnosticada na região Nordeste, devido as plantações de café, principalmente na Bahia. E foi de lá que em 1908 foi descrito o ciclo de *S mansoni* por Pirajá da Silva, ratificando o encontro de uma nova espécie, agora no continente americano e descrita no continente africano por Sambom em 1907 (Falcão 2008). Esta espécie é a única autóctone no Brasil.

Em decorrência dos ciclos econômicos como: café, cana de açúcar, gado leiteiro e mineração, a esquistossomose se expandiu para a região sudeste e demais regiões do país, associada principalmente a presença de moluscos vetores, em especial *Biomphalaria glabrata*, principal hospedeira intermediária no Brasil. Com o passar dos anos, difundiu-se por extensas áreas rurais e cidades subdesenvolvidas, onde faltam infraestrutura sanitária (Sarvel et al. 2011), alcançou magnitude e prevalência de grande relevância, acometendo milhões de brasileiros e transformando-se em um grave problema de saúde pública (Ministério da Saúde 2017). Além disso, existem relatos de casos de esquistossomose em áreas urbanas e turísticas, como Porto de Galinhas em Pernambuco, o que tem colocado em risco de contrair a esquistossomose, diversos turistas brasileiros e estrangeiros. Há dezenove anos atrás ocorreu um surto epidêmico na localidade, acometendo 662 pessoas, provocado pela junção de especulação imobiliária e enchentes. Atualmente ainda provocado pelo crescimento urbano desordenado, a esquistossomose continua sendo um risco para viajantes, situada em município endêmicos e com possibilidade de contaminação pós chuva, devido a enchentes locais. A situação não mudou, tem se agravado (Barbosa et al. 2015).

Crianças em idade escolar são as principais vítimas da esquistossomose (Vennervald et al. 1998; Kabatereine et al. 2004; Salam et al. 2014) por estarem mais expostas a transmissão do parasito, devido as atividades de lazer. No Brasil, a prevalência da esquistossomose mansônica, de acordo com dados do Ministério da Saúde (MS), é de seis milhões de pessoas, distribuídas nas cinco regiões do país, 1,5 milhões de pessoas com o risco de contrair a doença, por residirem em áreas endêmicas, 175 hospitalizações e 461 óbitos em 2015, segundo Nascimento et al (2018).

As áreas endêmicas e focais para esquistossomose incluem 19 (70,37%) dos 26 estados da federação e do Distrito federal, compreendendo os Estados da região nordeste, desde Maranhão até Sergipe e os Estados do sudeste e sul do País (Figura 2). As áreas de maior endemicidade incluem a maioria dos Estados do Nordeste desde Pernambuco até a Bahia e o Estado de Minas gerais na região sudeste (Figura 2).

Em 2018 foi publicado um novo inquérito nacional de prevalência da esquistossomose mansoni e geohelmintoses realizado em escolares (Katz et al 2018), demonstrando que houve uma redução geral no número de casos da doença no País, totalizando uma prevalência global de 0,99%. Foram investigados 521

municípios, 197.564 escolares na faixa de 7 a 17 anos. Segundo os dados do inquérito, nas áreas endêmicas a proporção de positivos para o país foi de 0,27% para municípios com mais de 500.000 habitantes e 3,28% para os de menos 500.000 habitantes. Já nas áreas não endêmicas, as proporções foram ainda menores 0,05% e 0,13% para municípios com mais ou menos 500.00 habitantes, respectivamente. Os municípios de área endêmica com mais de 500.000 habitantes que apresentaram o maior número de positivos foi Rio de Janeiro (2,80%), Pernambuco (2,48%) e Sergipe (2,28%). Nas áreas endêmicas com população com menos de 500.000 mil habitantes, os municípios mais afetados pertenciam aos seguintes Estados: Sergipe (10,67%), Pernambuco (3,77%), Alagoas (3,35%), Minas Gerais (5,81%), Bahia (2,91%) e Espírito Santo (1,02%).

Este inquérito nos dá uma visão limitada do problema da esquistossomose mansônica no país, pois além de restringir a faixa etária, apresentou dados de municípios que não demonstraram histórico para esquistossomose autóctone, o que pode ter afetado o inquérito global, todavia nos dá um indicador de continuidade de endemicidade da doença, apesar dos 44 anos de um programa de controle da esquistossomose institucionalizado no país.

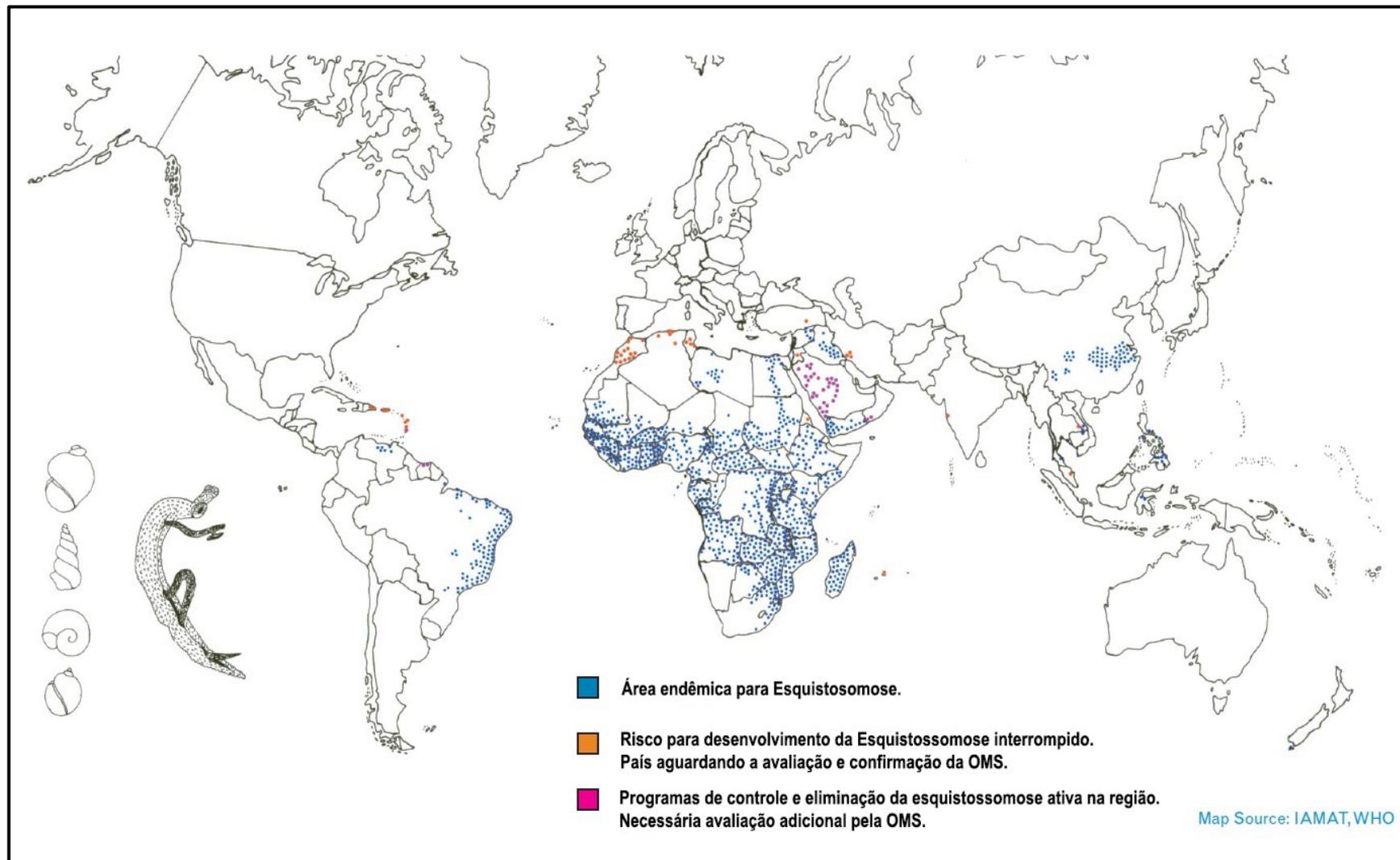
Atualmente para o controle da esquistossomose, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda o uso do medicamento Praziquantel (PZQ) na população, por reduzir a prevalência e morbidade da doença, devido à sua ação 'esquistossomicida' (Olliaro et al. 2011). As diretrizes atuais da OMS sobre como conduzir o tratamento para o controle de morbidade grave da doença foram desenvolvidas em 2002 e 2006 (WHO 2002 e 2006) e incorporadas como ações oficiais pelo Ministério da Saúde no Brasil (Ministério da Saúde 2014 e 2017). Dentre essas ações recomenda-se o tratamento com praziquantel em crianças, jovens e adultos de acordo com endemicidade. Em áreas de alta endemicidade (positividade superior a 25%) preconiza-se o tratamento de toda a população local, mesmo sem diagnóstico de positividade. Em áreas de média endemicidade (15 a 25%) recomenda-se o tratamento dos casos positivos e de seus respectivos conviventes, mesmo sem diagnóstico prévio. Somente em locais com baixa endemicidade (positividade inferior a 15%) e nos casos isolados que se recomenda o tratamento apenas dos casos positivos. Além disso, outras ações são sugeridas como fornecimento de água potável, saneamento adequado e controle dos hospedeiros intermediários com moluscicida químico.

Em 2015 foi realizado um estudo transversal sobre o custo da esquistossomose no Brasil tendo como alvo a eliminação como um problema de saúde pública, Nascimento et al. (2018) relataram que a doença apresenta um custo de aproximadamente 165 milhões de reais aos cofres públicos, incluindo tratamentos, internações e tempo de vida perdidos pela doença. Destes 94,61% estão atribuídos a custos indiretos como perda de renda da população ativa devido a morte prematura, perda de renda e custos com remédios e internações, devido ao tempo de hospitalização e pagamento de auxílio doença, devido ao afastamento do trabalho relacionado a esquistossomose. Os estados mais afetados com estes custos foram Pernambuco e Minas gerais. Os autores chamam a atenção para o problema de saúde pública e sua carga econômica para o Brasil.

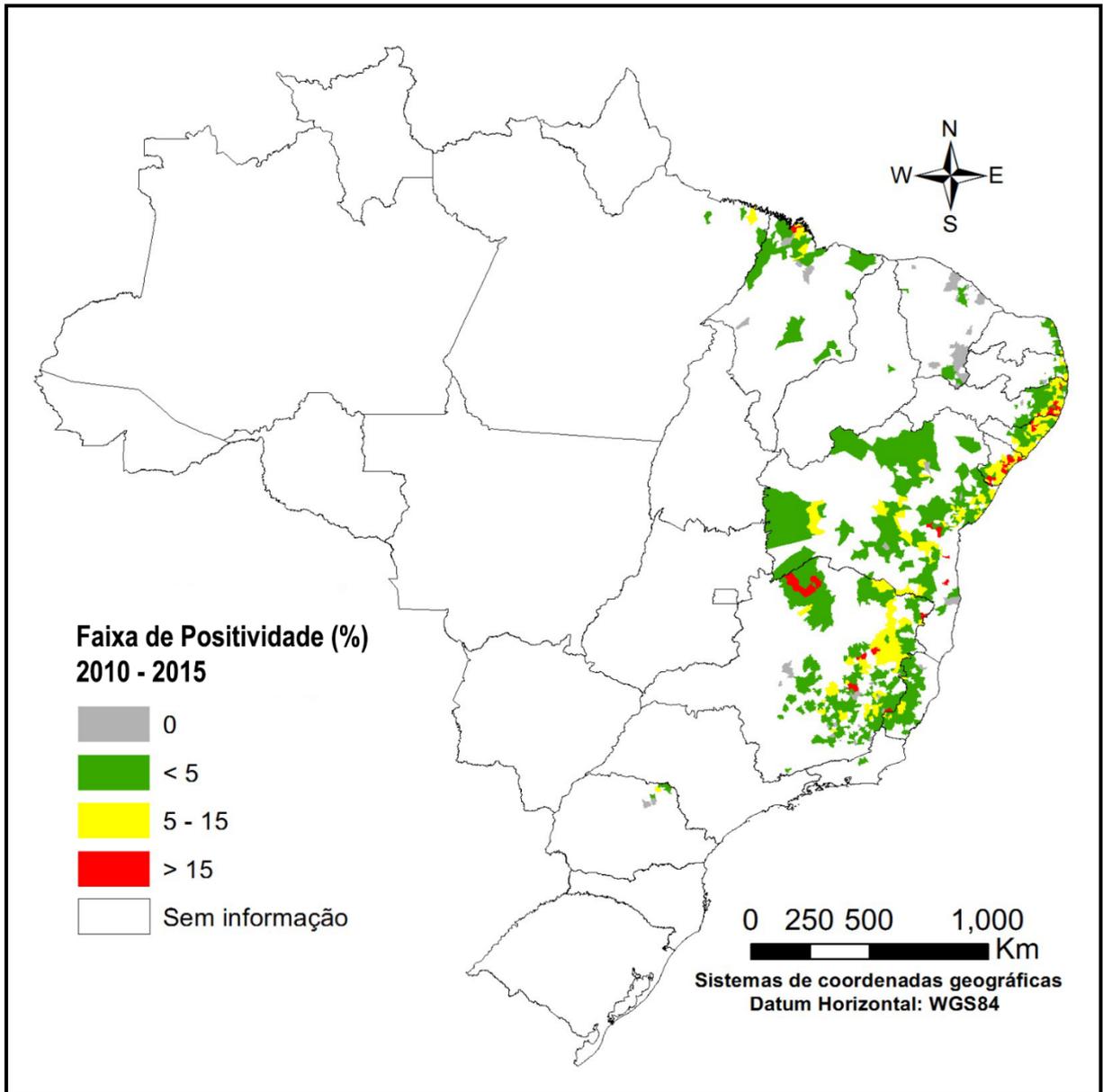
Segundo a WHO (2018) no mundo existem diversos relatos de sucesso para o controle da esquistossomose, principalmente associados a quimioterapia preventiva e organização dos serviços de saúde por meio dos sistemas de atenção primária com redução significativa da transmissão. No Brasil, o tratamento com Praziquantel em larga escala, o diagnóstico rápido e controle de moluscos preconizados nos programas de controle resultaram em redução significativa dos índices de gravidade e morbidade da doença. No entanto, a transmissão ainda se encontra em expansão.

Para reduzir a transmissão e eliminar a esquistossomose como um problema de saúde pública, o Brasil se tornou um membro signatário da resolução WHA 65.21 da OMS desde 2012. A resolução preconiza a quimioterapia preventiva para média e alta endemicidade, educação em saúde, saneamento básico e controle de moluscos hospedeiros. No entanto, a literatura apresenta poucos relatos de estudos integrados e detalhados com ações multissetoriais e com resultados relevantes (WHO 2012).

Tendo em vista os dois principais cenários apresentados, baixa prevalência entre escolares relatada no inquérito nacional em 2018 e o alto custo para o controlar a doença no País com quimioterapia preventiva e atenção secundária e terciária em 2019, a esquistossomose precisa ainda de estudos epidemiológicos mais pormenorizados e detalhados.



**Figura 1. Distribuição da Esquistossomose no Mundo, de acordo com informações do ano de 2015 da Organização Mundial de Saúde (Adaptado).**  
 Fonte: IAMAT e OMS Disponível em: <https://www.iamat.org/risks/schistosomiasis#>



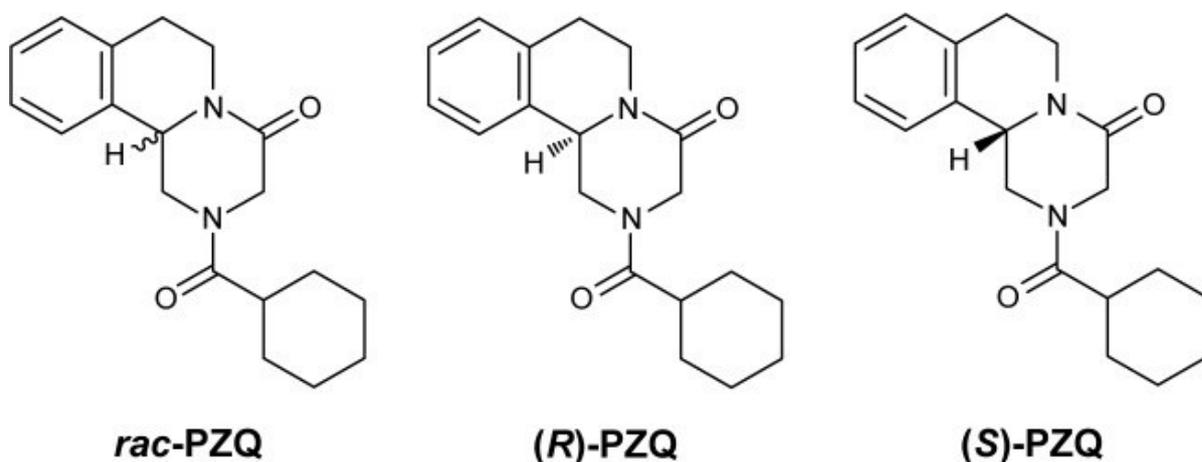
**Figura 2. Faixa de positividade (%) da Esquistossomose no Brasil, no período de 2010 à 2015.**  
 Fonte: portalsaude.saude.gov.br  
 Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/jpg/2016/julho/08/mapa-distribuicao-esquistossomose.jpg>

## 1.2 Praziquantel

O Praziquantel (PZQ) foi desenvolvido pela Bayer em 1972. Trata-se de um derivado da pirazoisquinolona e foi avaliado inicialmente como um medicamento tranquilizante (Seubert et al. 1977; Reich & Govindaraj 1998) porém estudos posteriores identificaram seu potencial antihelmíntico (Thomas & Gönnert 1977; Leopold 1978).

Os primeiros ensaios clínicos ocorreram no final da década de 70, em parceria com a OMS, em áreas endêmicas para as três principais espécies: *S. mansoni* (Katz et al. 1979), *S. haematobium* (Davis et al. 1979) e *S. japonicum* (Ishizaki et al. 1979). Todos estes ensaios, bem como numerosos ensaios subsequentes, foram extremamente bem sucedidos, apontando não só a eficácia do PZQ para o tratamento da esquistossomose nas cinco espécies de *Schistosoma* spp como também para a teníase, cisticercose, infecções causadas por *Diphyllobothrium* spp e *Hymenolepis nana*. Esses resultados corroboram com a escolha do Praziquantel como a droga de eleição para o tratamento da esquistossomose pela OMS e está indicado na lista de medicamentos essenciais preconizados (Greenberg 2005; Taylor 2008; WHO 2017).

O praziquantel disponível atualmente no mercado é uma mistura racêmica (1:1 na mistura de enantiômeros) de enantiômeros R e S (Figura 3), sendo que apenas o enantiômero R possui atividade antiesquistossomótica, demonstrado em experimentos *in vivo* e *in vitro* (Campos 2009; Farias 2013, Xiao et al. 1989; Wu et al. 1991). Ao enantiômero S estão associadas não só a inatividade como também a toxicidade, o sabor amargo e os efeitos colaterais apresentados pelo uso do medicamento (Lim et al. 1995; Cioli 1998; Meier & Blaschke 2001; Fenwick et al. 2003; Greenberg 2005; Roszkowski et al. 2006).



**Figura 3. Fórmula estrutural do Praziquantel e seus Enantiômeros.**

rac-PZQ: mistura racêmica do Praziquantel; (R)-PZQ: enantiômero ativo e (S)-PZQ: enantiômero inativo.

No Brasil, o praziquantel é produzido pelo Instituto de Tecnologia e Fármacos (Farmanguinhos/FioCruz), diminuindo os custos de produção e facilitando a distribuição do medicamento aos Estados da União.

O medicamento é apresentado em comprimidos de 600 mg, com administração oral e em dose única. Em adultos a dose recomendada é de 50 mg/kg e em crianças a dosagem é um pouco maior, 60 mg/kg (Ministério da Saúde 2017). Alguns estudos demonstraram que a administração da droga logo após as refeições aumenta significativamente a biodisponibilidade do praziquantel, sem afetar sua eliminação pelo corpo humano (Mandour et al 1990; Homeida et al 1994; Castro et al 2000). Esse efeito ainda não foi elucidado, mas pode estar relacionado com possíveis alterações no fluxo hepático que atuam no metabolismo da droga no fígado (Svensson et al. 1983; Castro et al 2000). O praziquantel é rapidamente absorvido pelo corpo após sua administração sua concentração plasmática máxima é alcançada em 1 a 3 horas pós-tratamento.

Estudos experimentais *in vitro* e *in vivo* demonstraram que o praziquantel não age em formas imaturas dos parasitos, ou seja, sua eficácia é apenas no período patente da infecção (Cioli & Pica-Mattoccia 2003). Apesar de seu mecanismo de ação não ter sido elucidado completamente, alguns efeitos desse fármaco como contração muscular, dano tegumentar e alterações metabólicas já foram avaliados em outros experimentos (Pax et al. 1978; Becker et al. 1980; Mehlhorn et al. 1981; Lima et al. 1994; Ribeiro et al. 1998; Oliveira et al. 2006). A contração muscular, seguido da paralisia do verme, provoca o relaxamento do acetábulo e a desafixação do verme no tecido do hospedeiro (Cioli & Pica-Mattoccia, 2003), possibilitando a mobilidade dos vermes adultos para o fígado. Outro efeito observado refere-se a alterações

morfológicas no tegumento do verme adulto representadas pela vacuolização da base do tegumento e formação de bolhas na superfície (Becker et al. 1980; Mehlhorn et al. 1981). Essas alterações contribuem para a morte do parasito, seja de uma forma direta ou por reação do sistema immune do parasitado aos antígenos expostos do verme (Harnett & Kusel, 1986; Doenhoff *et al.*, 1987; Modha *et al.*, 1990).

Em um estudo desenvolvido por Oliveira et al (2006), o PZQ apresentou ação inibitória na atividade excretora dos vermes adultos de *S. mansoni*. Alguns estudos sugerem que um possível alvo molecular do praziquantel sejam os canais de cálcio do verme adulto (Cioli et al. 1995; Kohn et al. 2001). Ribeiro et al (1998) avaliou a concentração de glutathione em vermes adultos e observou uma redução expressiva deste peptídeo, após o tratamento com PZQ. A glutathione está envolvida síntese do DNA e proteínas, atividades enzimáticas, transporte e proteção celular e as alterações em sua concentração podem comprometer a vida do parasito (Meister & Anderson 1983).

Os efeitos colaterais são transitórios, destacando-se gosto metálico na boca, dor abdominal, diarreia, astenia, cefaleia, tonturas, febre e reações urticariformes (Lambertucci et al. 2000; Rang et al. 2002). O medicamento é contraindicado para crianças menores de quatro anos e não aconselhado para lactantes e gestantes durante o primeiro trimestre de gravidez, visto que não existem estudos para determinar a segurança e eficácia desse tratamento em mulheres com essas condições. Caso a lactante precise ser medicada, ela só deverá amamentar a criança 72 horas após a administração do fármaco. O PZQ também possui contraindicação para pacientes com hipersensibilidade ao medicamento, cisticercose ocular (risco de lesão ocular), complicações severas de origem cardíaca e hepática e renais. A associação de alguns medicamentos como a rifampicina e cetoconazol, não é preocupada pois pode reduzir os níveis séricos do PZQ.

A toxicidade metabólica e genotoxicidade ao Praziquantel tem sido avaliada e estudada desde década de 80, quando se demonstrou em estudos experimentais baixa toxicidade em curto e longo prazo e resultados não significativos a modificações genéticas (Frohberg 1984; Kramers et al. 1991; Herrera et al. 1994). No entanto, em um estudo experimental mais recente Sun et al. (2016) avaliaram a citotoxicidade dos enantiômeros do Praziquantel, verificando que o (S)-PZQ, enantiômero associado aos efeitos colaterais observados no tratamento com humanos, apresentou toxicidade elevada comparado ao (R)-PZQ.

Apesar da eficácia comprovada do Praziquantel, a forma de aplicação do medicamento em áreas endêmicas (administração em massa da droga), tratamentos repetitivos e a utilização de sub-dosagens do medicamento podem gerar uma seleção de cepas resistentes (Dias et al. 1978; Stelma et al. 1995; Fallon et al. 1994). A resistência ao Praziquantel tem sido apenas evidenciada para infecções com *S. mansoni*. Nas infecções por *S. japonicum* e *S. haematobium*, estudos epidemiológicos apontam eficácia deste medicamento em áreas endêmicas, no entanto em relação a *S. mansoni*, principalmente na África, no Senegal tem sido evidenciadas taxas de cura extremamente baixas (18%) (Vale et al. 2017).

Um estudo detalhado sobre resistência com Praziquantel já tinha sido realizado em condições experimentais por Fallon & Doenhoff (1994), *in vivo* com camundongos com o objetivo de induzir a resistência ao PZQ. Ao longo de 7 gerações de administração de doses sub-curativas do PZQ, o *S. mansoni* desenvolveu resistência ao medicamento, apresentando uma sobrevivência de 93% da população de vermes adultos que foram expostos a pressão contínua de doses sub-curativas do fármaco. Ismail et al (1994), realizaram um estudo similar ao anterior e verificaram a resistência ao PZQ na dose sub-curativa (300 mg/kg), após várias gerações de tratamento com essa dose. Couto et al (2011), conseguiram induzir a resistência no *S. mansoni* tratando caramujos infectados com uma dose sub-curativa de PZQ (100 mg/kg) durante cinco dias consecutivos. Subsequentemente, camundongos foram infectados com cercárias liberadas desses caramujos e foram submetidos a tratamentos com outras dosagens de PZQ (200 e 400 mg/kg) e o número médio de vermes recuperados por perfusão foi significativamente superior nos grupos tratados comparados com o grupo apenas infectado.

Estes estudos demonstram que a resistência está associada a tratamentos sucessivos, principalmente em massa e sem diagnóstico prévio, como é preconizado pela OMS. Além disso, as contra-indicações (mulheres grávidas ou lactantes, crianças abaixo de dois anos e pacientes com doença hepática crônica) e as reinfecções contribuem para o aumento da prevalência de indivíduos parasitados (Utzing et al. 2003; Abdulla et al. 2007). Devido a este fato, a busca por novos medicamentos ou os mesmos em outras formulações torna-se relevante.

### 1.3 Nanoencapsulamento

O nanoencapsulamento é um procedimento que permite a distribuição de bioativos até um alvo desejado dentro do corpo humano. Para que esse processo seja realizado com eficiência, os bioativos ficam confinados em sistemas vesiculares conhecidos como nanocápsulas. Na indústria farmacêutica essa tecnologia tem sido empregada para entrega de medicamentos em alvos predeterminados e apresenta uma série de vantagens: diminuição da quantidade de fármaco; diminuição da absorção sistêmica do medicamento, reduzindo os possíveis efeitos colaterais; direcionamento preciso do medicamento e aumento do tempo de ação no organismo, pois a liberação dos bioativos é gradual e controlada (Reis et al 2006; Kumari et al 2014; Suganya & Anuradha 2017).

O emprego da nanotecnologia em insumos farmacêuticos iniciou-se na década de 60, com a utilização de lipossomas na encapsulação de drogas lipofílicas (Sessa 1968) e avançou ao longo dos anos com o desenvolvimento de diversas estruturas para a formação das nanocápsulas, conforme pode ser observado na Figura 4.

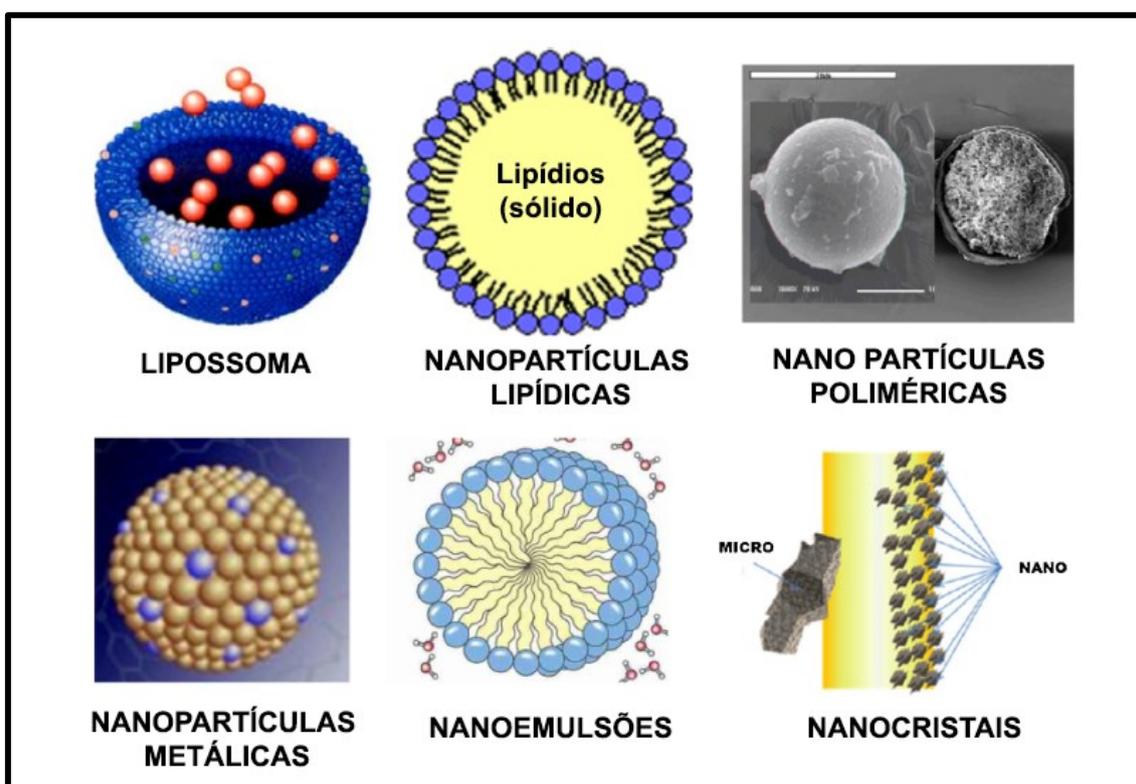


Figura 4. Principais nanoestruturas utilizadas no nanoencapsulamento.

As nanopartículas poliméricas são constituídas por uma nanocápsula com um revestimento polimérico e uma cavidade aquosa ou oleosa que abriga o fármaco (Islan et al. 2017). Se destacaram na produção de medicamentos nanoencapsulados na última década por aumentarem a estabilidade química e a solubilidade em água de fármacos hidrofóbicos (Mainardes & Evangelista 2005; Fonseca et al. 2013a e 2013b), permitindo, assim, o controle e a liberação gradual dos fármacos.

Dentre a gama de polímeros disponíveis e utilizados na nanotecnologia podemos destacar o Poli (metacrilato de metila), PMMA, mais conhecido pelo nome comercial Eudragit®. Trata-se de uma nanopartícula polimérica que apresenta uma excelente resistência à luz, umidade e calor (Tang et al. 2011) e tem se destacado pela fácil dissolução no ambiente gástrico (Wang et al 2004) e aumento da solubilidade de fármacos lipofílicos em água (Jung et al. 1999). O PMMA é uma nanopartícula biocompatível o que confere uma vasta possibilidade de utilizações dentro da área farmacêutica, desde sua conjugação com drogas bioativas ate a participação de processos enzimáticos (Uchegbu & Schatzlein 2006; Tomar et al. 2011).

#### **1.4 Justificativa**

Os países endêmicos membros da OMS adotaram a resolução WHA 65.21 da Assembleia Mundial de Saúde, visando eliminar a esquistossomose como um problema de saúde pública. Em atendimento a esse anexo, o Ministério da Saúde incluiu a esquistossomose num plano integrado de ações estratégicas para controle ou eliminação de doenças negligenciadas prioritárias no âmbito do Programa Brasil sem Miséria (Ministério da Saúde 2014). As estratégias de controle recomendadas para a esquistossomose buscam reduzir a prevalência da infecção, a ocorrência de formas graves e óbitos e o risco de expansão da doença, através do diagnóstico precoce e tratamento com praziquantel (PQZ), vigilância e controle dos hospedeiros intermediários, educação em saúde e saneamento ambiental.

Além disso, é importante levar em consideração que algumas pessoas infectadas não podem realizar o tratamento com o praziquantel, visto suas inúmeras contraindicações. Como esse é único medicamento utilizado atualmente para o tratamento da esquistossomose, esses pacientes podem desenvolver estágios mais graves da doença, podendo evoluir para o óbito e/ou mantendo a infecção presente e contínua na área endêmica.

Neste contexto, testes com novas formulações do praziquantel tornaram relevantes, visto que esse medicamento apresenta uma moderada toxicidade e é ineficaz para o tratamento da doença no estágio pré-patente (formas larvares jovens). Como o tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde é compulsório para qualquer estágio da doença, queremos ressaltar com esse estudo não só a ineficácia do tratamento em infecções recentes como também a necessidade de busca e implementação de novos fármacos para um tratamento mais efetivo da esquistossomose.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a eficácia e as alterações nas enzimas hepáticas de duas formulações de Praziquantel nas fases do ciclo de *Schistosoma mansoni* em condições experimentais, analisando a efetividade do tratamento para o controle da esquistossomose mansônica no Brasil e contribuindo para uma nova abordagem terapêutica.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Observar a eficácia do tratamento nos períodos pré-patente e patente da infecção esquistossomótica com as duas formulações contendo praziquantel separadamente em infecções experimentais;
- Identificar as possíveis alterações nas enzimas hepáticas nos hospedeiros tratados com as duas formulações contendo praziquantel separadamente;
- Evidenciar a efetividade do tratamento com praziquantel no controle da esquistossomose mansônica no Brasil;
- Verificar a ação do fármaco praziquantel nanoencapsulado (PQZ-N) como terapia alternativa para o tratamento da infecção esquistossomótica.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Delineamento do estudo**

Trata-se de um estudo experimental pré-clínico inteiramente causalizado com amostragem aleatória simples, cuja meta foi avaliar a eficácia no tratamento da infecção esquistossomótica e possíveis efeitos hepatotóxicos de uma formulação nanoencapsulada contendo praziquantel, comparativamente à formulação pura do praziquantel, livre de quaisquer outras partículas, em hospedeiros não humanos.

#### **3.2 Modelo Animal e Parasitos**

Foram utilizados 190 camundongos da espécie *Mus musculus* (linhagem Swiss Webster), fêmeas, com aproximadamente 4 semanas de idade, fornecidos pelo ICTB/FIOCRUZ. Os camundongos foram mantidos, infectados e eutanasiados nos biotérios dos Pavilhões Lauro Travassos e Cardoso Fontes, seguindo as normas de bioética e biossegurança do IOC/FIOCRUZ. Todos animais foram mantidos com ciclo de luz 12 horas claro/12 horas escuro, controle de umidade, enriquecimento ambiental, alimentados com ração (previamente autoclavada) e água *ad libitum*.

A infecção experimental dos camundongos foi realizada individualmente, por via subcutânea com a suspensão de 150 ( $\pm$  10) cercárias em água desclorada, no máximo 2 horas após a liberação destas cercárias pelos caramujos. A linhagem LE de *S. mansoni* utilizada neste experimento foi proveniente do Serviço de Referência em Esquistossomose do Laboratório de Malacologia do IOC/Fiocruz. O procedimento foi realizado com o auxílio de uma seringa descartável de insulina de 1 ml e agulha de 0,4 mm x 13 mm, conforme preconizado por Peters & Warren (1969), com a inoculação de 0,3 ml dessa suspensão por camundongo.

Todos os animais foram infectados uma única vez e acompanhados até a coleta de sangue para a realização dos exames sorológicos.

### 3.3 Fármacos e dose utilizada

Foram utilizadas duas formulações contendo praziquantel. A formulação pura e livre de outras partículas (PZQ-L), foi cedida pela Dra. Alessandra Lifstitch Viçosa do laboratório de Farmacotécnica Experimental (FARMANGUINHOS/FIOCRUZ). As especificações seguem abaixo:

**Descrição:** Praziquantel Micronizado

**Lote Fornecedor:** 0000002237

**Fabricação:** 09/01/2018

**Validade:** 02/01/2021

A formulação nanoencapsulada do praziquantel (PZQ-N) foi fornecida pelo Dr. Cláudio Salomon do Departamento de Farmácia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas e Bioquímicas, da Universidade Nacional de Rosário (Argentina).

O praziquantel nanoencapsulado foi produzido por nanoprecipitação, utilizando um polímero (Eudragit® E), contido em uma fase orgânica e a droga em questão (PZQ) em uma fase aquosa contendo um estabilizador para garantir a utilização dessa nanopartícula em várias formulações de medicamentos (Molpeceres et al. 1996; Quintanar-Guerrero et al. 1999). O PVA (poli álcool vinílico) foi utilizado como um agente antiagregante, impedindo a coalescência entre as nanopartículas. Após esse processo, a nanosuspensão obtida foi seca por “*Spray Drying*”, utilizando um equipamento de secagem por pulverização (Buchi B-290), usando Maltodextrina como diluente, para obter uma formulação sólida que garanta a estabilidade durante os experimentos subsequentes.

A composição quali-quantitativa da nanopartícula é: 20,8% de Praziquantel (0,208mg de PZQ em 1 mg do material nanoparticulado), 20,8% de Eudragit® E, 8,4% de PVA e 50% Maltodextrina.

A administração dos medicamentos aos camundongos foi realizada em suspensão aquosa na dose única de 400 mg/kg através da gavagem. Esse procedimento permite a inoculação do medicamento diretamente no esôfago, de forma precisa e na dosagem exata já preestabelecida (MCTIC 2016). A escolha da dosagem se baseia em estudos que atestam sua eficácia no tratamento da infecção esquistossomótica em camundongos (Couto et al. 2011; Araújo et al. 1996).

### 3.4 Determinação dos grupos experimentais

Os camundongos foram alocados em seis grupos experimentais:

1. **Grupo IN**: formado por animais infectados por *Schistosoma mansoni*, porém não receberam tratamento com Praziquantel nanoencapsulado (N= 30 animais). Experimento em duplicata acompanhando os tratamentos.

2. **Grupo TR-PZQ-N**: formado por animais livres de infecção por *Schistosoma mansoni* que receberam tratamento com Praziquantel nanoencapsulado (N=30 animais).

3. **Grupo INTR-PZQ-N**: formado por animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados posteriormente com Praziquantel nanoencapsulado. (N= 40 animais).

4. **Grupo TR-PZQ-L**: formado por animais livres de infecção por *Schistosoma mansoni* que receberam tratamento com Praziquantel livre (N=30 animais).

5. **Grupo INTR-PZQ-L**: formado por animais infectados por *Schistosoma mansoni* e tratados posteriormente com Praziquantel livre. (N= 40 animais).

6. **Grupo CONTROLE** – formado por animais livres de infecção por *Schistosoma mansoni* e que também não receberam tratamento com Praziquantel (N=20 animais). Esse grupo foi criado para servir como um baseline para o experimento visto que não sofrerá qualquer tipo de intervenção experimental.

Com o intuito de observar o comportamento da infecção, dos tratamentos com PZQ-L e PZQ-N e da conjugação de ambos (infecção e tratamento) nas fases pré-patente e patente da infecção esquistossomótica, o grupo experimental foi dividido em três subgrupos, de acordo com o tempo em que o animal recebeu o tratamento após a infecção: 15 dias (N=10), 30 dias (N=10) e 60 dias (N=20). Esses intervalos de tempo foram importantes para evidenciar os momentos pré-patentes (15 e 30 dias) e patente (60 dias) da infecção esquistossomótica. Vinte e quatro horas após o tratamento com praziquantel, foi realizada a coleta de sangue de dez camundongos de cada grupo, seguida da eutanásia dos mesmos, para a realização de exames sorológicos.

Para que fosse possível realizar qualquer inferência entre os resultados dos exames dos camundongos, foram realizadas coletas de sangue nos mesmos intervalos de tempo nos animais dos demais grupos experimentais e controle.

### **3.5 Coleta de sangue e parâmetros bioquímicos analisados**

Todos os exames sorológicos foram realizados na Plataforma Tecnológica da Fiocruz – Animais de Laboratório/Análises Clínicas sediada no ICTB/FIOCRUZ. Foram analisados os seguintes parâmetros bioquímicos: Fosfatase Alcalina (FA; valor de referência: 62 a 209 U/L), Alanina Aminotransferase (ALT; valor de referência: 28 a 132 U/L), Aspartato Aminotransferase (AST; valor de referência: 59 a 247 U/L) e Proteínas Totais (PT; valor de referência: 3,6 a 6,6 g/dL). O equipamento utilizado nas análises foi o Vitros 250 (Ortho clinical - Johnson & Johnson), através da metodologia de química seca. Os parâmetros laboratoriais acima foram analisados em um sistema modular Roche / Hitachi (Roche Diagnostics, IN, EUA).

As coletas foram realizadas por punção cardíaca, utilizando uma seringa descartável com agulha de 20 mm x 0,55 mm em animais previamente anestesiados com 100mg/kg de cetamina associado a 10mg/kg de cloridrato de xilazina por via IP e a profundidade anestésica foi verificada com o teste de sensibilidade a estímulos dolorosos. Este procedimento foi realizado pela médica veterinária, conforme previsto pelo CEUA/IOC 009/2015.

O sangue coletado foi transferido para um microtubo para coleta de sangue com gel e ativador de coágulo com capacidade para 500 µl e centrifugado à 13.000 rpm, por 3 minutos, em temperatura ambiente. Após esse procedimento, o soro foi transferido para um eppendorf de 0,5 ml e encaminhado para a plataforma de análises clínicas do ICTB/FIOCRUZ para as análises sorológicas.

Os animais que não foram ao óbito após esse procedimento foram eutanasiados por overdose de barbitúrico: administração, por via intracardíaca, de tiopental sódico 2,5% (300 mg/kg). Este procedimento também foi realizado pela médica veterinária do grupo.

### **3.6 Dinâmica parasitária**

A dinâmica parasitária foi avaliada através da contagem de ovos por grama de fezes (OPG) pelo método de Kato-Katz (Katz et al. 1972). A coleta das fezes dos camundongos infectados foi realizada 60 dias após a infecção. Com o intuito de avaliar a carga parasitária antes e após o tratamento no subgrupo de 60 dias, apenas neste foi realizado uma segunda coleta de fezes, 30 dias após o tratamento (90 dias após a infecção).

As fezes foram coletadas no período da manhã de forma individualizada e durante uma hora, com o intuito de evitar o estresse dos animais. Após a coleta os camundongos voltaram para as suas respectivas gaiolas. Para cada amostra de fezes foram preparadas 3 (três) lâminas. Após a leitura em microscópio, realizou-se uma média aritmética dos ovos encontrados por amostra de fezes e o valor foi multiplicado pelo fator 24 para a obtenção da OPG (ovos por grama de fezes). A carga parasitária foi classificada em leve (1-99 opg), moderada (100-399 opg) ou intensa ( $\geq 400$  opg), de acordo com os critérios adotados pela Organização Mundial da Saúde (WHO 2002) e referenciados no protocolo do Kit de Kato-Katz.

### **3.7 Análise estatística dos dados**

Os parâmetros dos exames sorológicos e os resultados das quantidades dos ovos por grama de fezes, comparados entre os diferentes grupos de ambas as formulações farmacêuticas do PZQ, foram as variáveis consideradas e analisadas para a avaliação das respostas terapêuticas dos fármacos citados.

Os resultados dos exames de sangue e do OPG foram imputados no software de banco de dados Microsoft Access® e analisados nos programas SPSS versão 24.0 (IBM 2016) e R versão 3.5.2 (R Core Team 2018).

Para avaliar se o tratamento com praziquantel, tanto a formulação nanoencapsulada (PZQ-N) quanto a formulação livre (PZQ-L) possui algum efeito sobre a carga parasitária dos animais infectados, seja no período pré-patente (15 e 30 dias) ou no período patente da infecção (60 dias) foi realizado o teste de Kruskal-Wallis e o teste de comparações múltiplas de Dunn. O mesmo teste foi realizado para avaliar se houve ou não algum efeito referente ao momento em que o animal recebe o tratamento (estando infectado ou não por *S. mansoni*) nas alterações nos exames sorológicos. Foi estabelecido o nível de significância de 5% para todas as análises realizadas.

### **3.8 Considerações Éticas**

Todos os experimentos desenvolvidos no projeto de pesquisa foram realizados segundo as diretrizes internacionais válidas para a experimentação animal e estarão

de acordo com as regras do comitê de ética animal aprovado no CEUA (IOC/FIOCRUZ) nº L016/2015, com validade até 31/03/2019.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise do efeito do tratamento com ambas as formulações de Praziquantel na quantidade de ovos por grama de fezes dos camundongos (OPG) e da carga parasitária.

A quantidade de ovos por grama de fezes (OPG) após 60 e/ou 90 dias de infecção foi obtida, a partir dos resultados das leituras das lâminas pela técnica de Kato-Katz (Katz et al. 1972).

Para a avaliação do efeito do tratamento com praziquantel em camundongos infectados por *S. mansoni* no período patente da infecção foram realizadas comparações entre os grupos de camundongos infectados e tratados 60 dias após com praziquantel nanoencapsulado (INTR-PZQ-N), camundongos infectados e tratados 60 dias após com praziquantel puro (INTR-PZQ-L) e camundongos apenas infectados que não receberam tratamento (IN-PZQ). Não foram verificadas diferenças entre esses grupos com relação a quantidade de ovos por grama de fezes (OPG) antes do tratamento (Tabela 1), porém o tratamento com o praziquantel puro (PZQ-L) foi o mais eficaz, visto que, não foram encontrados ovos nas fezes dos camundongos tratados com essa formulação após 30 dias do tratamento. O grupo tratado com a formulação nanoencapsulada (PZQ-N) apresentou, após um mês de tratamento, um resultado muito similar aos grupos que não receberam tratamento em nenhum momento do experimento [ $\chi^2 (2) = 0,714; p = 1,000$ ].

Ao compararmos a quantidade de ovos por grama de fezes em camundongos do grupo INTR-PZQ-N (Tabela 1) constatamos que o PZQ-N não surtiu o efeito esperado no tratamento da infecção esquistossomótica, pois não ocorreu a diminuição da carga parasitária após o tratamento. Pelo contrário, a carga parasitária aumentou em 144,8%.

Quanto a carga parasitária, houve diferença entre os grupos infectado (IN-PZQ) e infectado e tratado com PZQ-N após o tratamento ( $p < 0,001$ ), evidenciando que o tratamento com a formulação nanoencapsulada não surtiu efeito (Tabela 1).

**Tabela 1. Quantidade média de ovos por grama de fezes (OPG) de camundongos no período patente da infecção esquistossomótica (60 dias após a infecção) antes e 30 dias após o tratamento com praziquantel nanoencapsulado (PZQ-N) e praziquantel livre (PZQ-L).**

Grupos Experimentais	N	Ovos por Grama de Fezes (OPG) (Carga parasitária)	
		Antes do Tratamento (60 dias após a infecção)	Após o Tratamento (90 dias após a infecção)
INTR-PZQ-N	10	90,4 (LEVE)	221,3 (MODERADA)
INTR-PZQ-L	10	117,6 (MODERADA)	0
IN-PZQ	20	246,7 (MODERADA)	NA
<b>p-valor</b>		0,539	< 0,001

Valor de  $p$  referente ao teste de Kruskal-Wallis. NA=não aplicável. Intervalo de confiança = 95%

INTR-PZQ-N: grupo formado por animais infectados e tratados 60 dias depois com praziquantel nanoencapsulado;

INTR-PZQ-L: grupo formado por animais infectados e tratados 60 dias depois com praziquantel livre; IN-PZQ:

grupo formado por animais infectados que não receberam nenhum tipo de tratamento.

Ao analisarmos o efeito do tratamento com o praziquantel nos períodos pré-patentes da infecção esquistossomótica (tratamentos realizados em animais infectados após 15 e 30 dias), não verificamos diferenças na quantidade de ovos por grama de fezes entre os grupos observados: INTR-PZQ-N (15 dias), INTR-PZQ-N (30 dias), INTR-PZQ-L (15 dias), INTR-PZQ-L (30 dias) e IN-PZQ (Tabela 2). Ainda assim, podemos verificar que os animais tratados com o praziquantel puro (PZQ-L) com 15 e 30 dias de tratamento eliminam 59% e 63% respectivamente, menos ovos por grama de fezes comparativamente aos animais tratados com a formulação nanoencapsulada do praziquantel (PZQ-N) no mesmo período.

Em comparação com o grupo somente infectado sem tratamento, a OPG do grupo infectado e tratado com PZQ-L em 15 e 30 dias reduziu respectivamente 70,1% e 67,2%, enquanto que o PZQ-N reduziu nos mesmos períodos 26,5% e 11,4%, respectivamente. Apesar da redução do número de ovos por grama de fezes nos dois tratamentos, pode-se observar que o PZQ-L nos períodos pré-patentes da infecção foi mais eficaz. Além disso, a carga parasitária nos dois períodos pré-patentes analisados no tratamento com PZQ-L foi considerada leve em comparação a carga observada após o tratamento com PZQ-N e ao grupo infectado sem tratamento. Em ambos os grupos a carga foi considerada moderada.

**Tabela 2. Quantidade média de ovos por grama de fezes (OPG) de camundongos, recolhidos 60 dias após a infecção e tratados com praziquantel nanoencapsulado (PZQ-N) e praziquantel livre (PZQ-L) no período pré-patente da infecção esquistossomótica.**

Grupos Experimentais	Dias após o tratamento	N	Ovos por Grama de Fezes (OPG) (CARGA PARASITÁRIA)	
			Antes do Tratamento	Após o Tratamento (60 dias após a infecção)
INTR-PZQ-N	15	10	NA	180,8 (MODERADA)
INTR-PZQ-L	15	10	NA	73,6 (LEVE)
INTR-PZQ-N	30	10	NA	218 (MODERADA)
INTR-PZQ-L	30	10	NA	80,8 (LEVE)
IN-PZQ	NA	40	246,7 (MODERADA)	NA
<b>p-valor</b>			NA	0,123

Valor de p referente ao teste de Kruskal-Wallis. NA=não aplicável.

INTR-PZQ-N: grupo formado por animais infectados e tratados 60 dias depois com praziquantel nanoencapsulado;

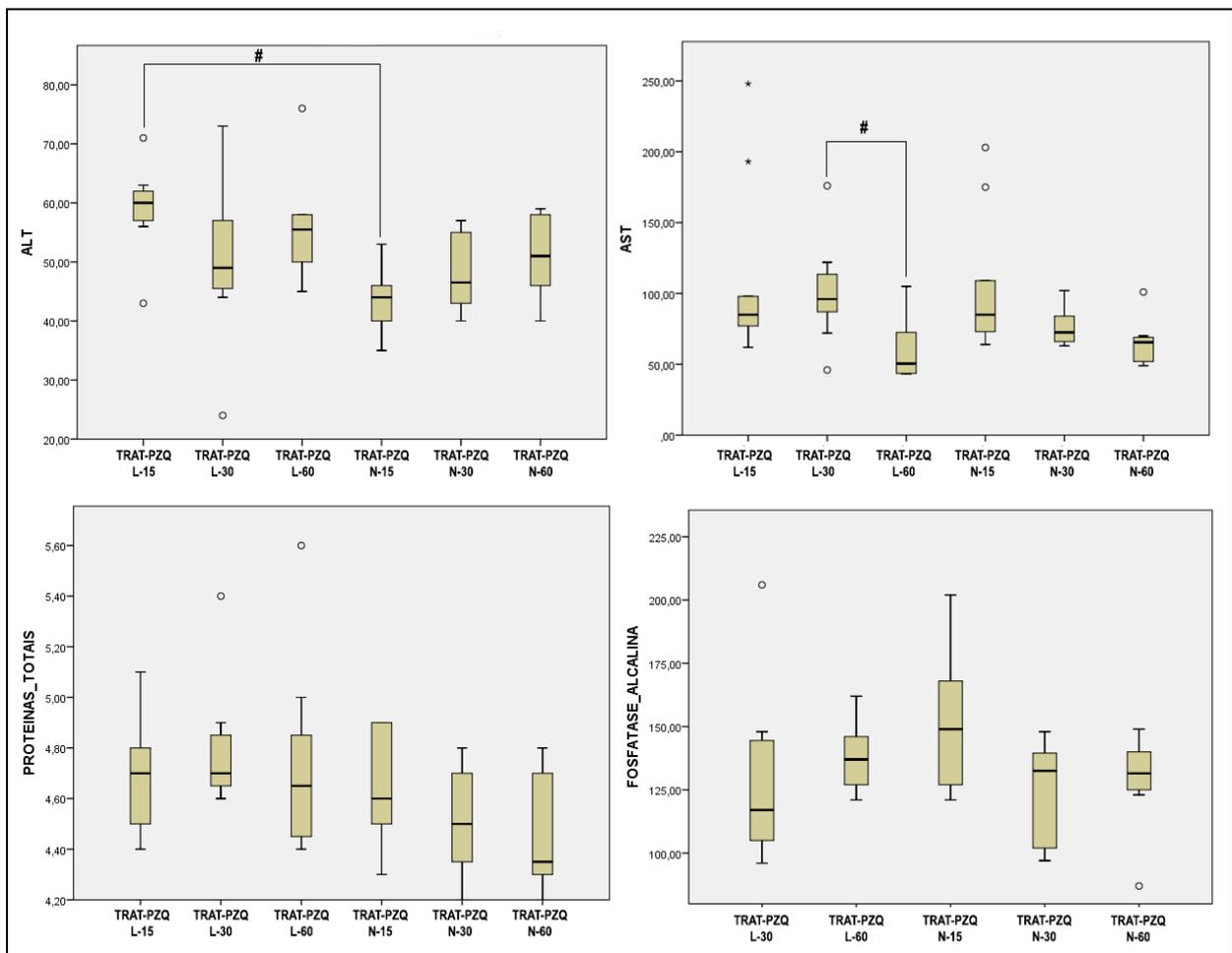
INTR-PZQ-L: grupo formado por animais infectados e tratados 60 dias depois com praziquantel livre; IN-PZQ:

grupo formado por animais infectados que não receberam nenhum tipo de tratamento.

#### **4.2 Análise do efeito do tratamento com ambas as formulações nos resultados sorológicos das enzimas hepáticas em diferentes períodos.**

Foram realizados exames sorológicos para avaliar quatro parâmetros hepáticos: ALT, AST, Fosfatase Alcalina e Proteínas Totais.

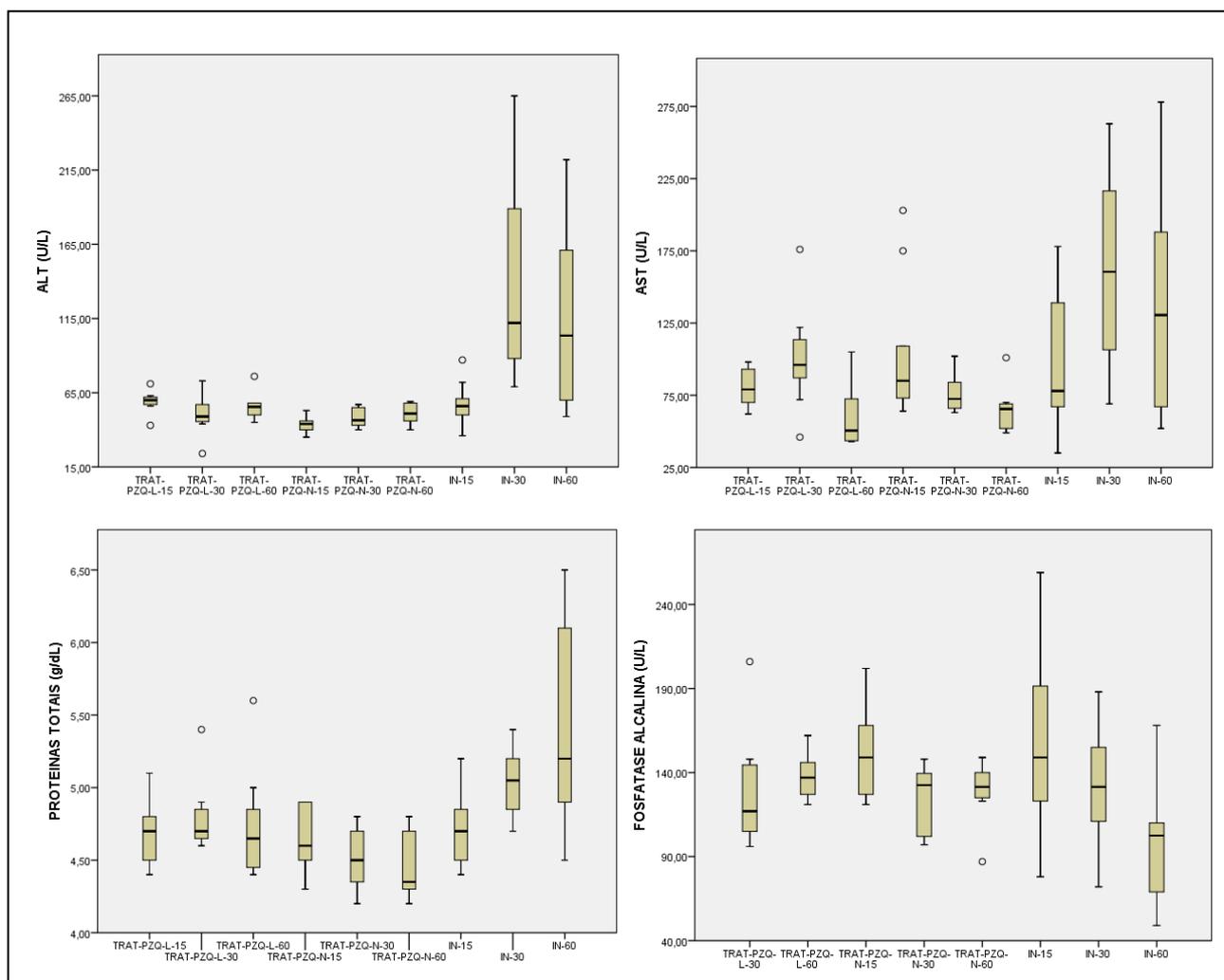
Na figura 5, foram comparados os resultados dos parâmetros hepáticos apenas entre os grupos que só receberam tratamento. O objetivo foi avaliar se o tratamento, seja com PZQ-N ou PZQ-L, alteraria a concentração dessas enzimas hepáticas nos camundongos estudados. Além disso, foi avaliado também se o tempo após o tratamento, visto que esses animais foram tratados no tempo zero do experimento, influenciaria a resposta desses exames. No parâmetro ALT, foram encontradas diferenças entre os grupos TRAT-PZQ-L-15 e TRAT-PZQ-N-15 ( $p=0,001$ ), demonstrando que o grupo tratado com PZQ-L apresentou níveis séricos de ALT mais elevados comparados ao grupo que foi tratado com PZQ-N. O resultado do parâmetro AST apontou diferenças entre os grupos TRAT-PZQ-L-30 e TRAT-PZQ-L-60 ( $p=0,014$ ), demonstrando um aumento na concentração plasmática desse parâmetro no grupo TRAT-PZQ-L-30. Não foram observadas diferenças nos resultados dos parâmetros Fosfatase Alcalina (FA) e Proteínas Totais (PT) entre os grupos comparados. Nenhum dos níveis de enzimas hepáticas em nenhum dos grupos avaliados ficou fora do intervalo de referência do teste laboratorial.



**Figura 5. Níveis séricos de enzimas hepáticas, em camundongos que receberam apenas tratamento com PZQ-N ou PZQ-L, estratificados pelo tipo de tratamento e pelo tempo após a administração do medicamento.**

Valor de p referente ao teste de Kruskal-Wallis. # $p < 0,05$ . ALT (alanina transaminase), AST (aspartato transaminase), PT (proteínas totais) e FA (fosfatase alcalina).

Analisando os resultados da concentração das enzimas hepáticas em animais apenas infectados (IN) e em animais apenas tratados (TRAT-PZQ), o efeito da infecção nas alterações desses exames é mais significativo. Os parâmetros mais sensíveis são ALT e AST e o efeito é mais acentuado no grupo IN-30 (Figura 6), porém nos resultados da Fosfatase Alcalina observamos valores mais altos no grupo IN-15. Apenas os grupos infectados (IN-15, IN-30 e IN-60) apresentaram valores acima do intervalo de referência nos parâmetros avaliados.



**Figura 6 - Níveis séricos de enzimas hepáticas, em camundongos que receberam apenas tratamento com PZQ-N ou PZQ-L ou foram infectados sem tratamento posterior, estratificados pelo tipo de tratamento e pelo tempo após a administração do medicamento ou após a infecção**

ALT (alanina transaminase), AST (aspartato transaminase), PT (proteínas totais) e FA (fosfatase alcalina).

## 5 DISCUSSÃO

A eliminação da esquistossomose mansônica como um problema de saúde pública tem sido o foco do controle desta doença no século XXI. Para tanto foi proposto pela OMS (WHO 2002) diferentes atividades, dentre elas o tratamento com praziquantel, independente do diagnóstico específico, em áreas endêmicas da esquistossomose.

Nessa pesquisa foram testadas a eficácia e a eficiência do tratamento com uma nova formulação do praziquantel, o nanoencapsulado. O polímero utilizado para essa nanoformulação foi o Eudragit® E e estudos anteriores apontam que a associação desse polímero com drogas hidrofóbicas (praziquantel, por exemplo) melhoram a eficácia dos fármacos, assim como sua solubilidade e biodisponibilidade (Dai & Wang, 2004; Chellampillai & Pawar 2011; Tang et al 2011; Kolenyak-Santos et al 2015). Para o tratamento da esquistossomose, esta formulação de PZQ nanoencapsulado não foi eficaz, pois aumentou a quantidade de ovos por grama de fezes e a carga parasitária dos animais infectados, após o tratamento no período patente. A carga parasitária e o OPG são indicadores de grande importância para o controle do tratamento da esquistossomose pois permitem avaliar o grau de morbidade da doença em áreas endêmicas.

Kolenyak-Santos e colaboradores (2015), avaliaram a eficácia de duas formulações nanoencapsuladas lipídicas do PZQ (NCL2 e NCL4) em um estudo *in vitro* com vermes adultos. Além da citotoxicidade e absorção intestinal do PZQ, foram verificadas a motilidade e a taxa de mortalidade dos vermes adultos, a oviposição e as alterações no tegumento de *S. mansoni*. As formulações nanoencapsuladas não só melhoraram a estabilidade do medicamento como também foram mais eficazes em todos os parâmetros analisados, ao serem comparadas com o praziquantel puro. Em um estudo similar, desenvolvido por Amara e colaboradores (2018), também foi verificada a eficácia de formulações nanoencapsuladas lipídicas com PZQ através da redução da carga parasitária de vermes adultos, melhoria das lesões hepáticas nos camundongos estudados e presença de danos no tegumento de adultos de *S. mansoni*. Outros estudos realizados com formulações nanoencapsuladas lipídicas contendo PZQ (Yang et al. 2009 e Mishra et al. 2014) corroboram com os resultados anteriores relacionando o aumento da atividade esquistossomicida do composto nanoencapsulado com a interação entre o tegumento do parasito e a matriz lipídica da capsula. Além disso o encapsulamento do PZQ reduz a citotoxicidade, indicando

que esse sistema de distribuição de medicamentos tende a ser promissor para o controle da esquistossomose, melhorando a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos tóxicos do PZQ.

Em um estudo realizado pela Merck (Münster et al. 2017) avaliando polímeros de Eudragit® e Kollidon para o nanoencapsulamento do Praziquantel, o Eudragit® E foi identificado como o que combina melhor as capacidades de mascaramento do sabor amargo do PZQ com as propriedades de liberação imediata do medicamento no sistema gastrointestinal. Entre as técnicas de encapsulamento avaliadas, a extrusão apresentou resultados mais eficazes quando comparada à técnica de secagem por pulverização (“*Spray Drying*”), visto que a primeira técnica possibilitou uma redução na liberação do PZQ em estudos simulados na saliva, auxiliando no mascaramento do sabor, e uma rápida liberação nos meios gástrico e intestinal simulados. O “*Spray Drying*” foi a técnica utilizada no presente estudo e como não foi realizado nenhum experimento de avaliação da liberação da capsula no sistema gastrointestinal, talvez esse procedimento tenha contribuído para ineficácia do PZQ nanoencapsulado nos experimentos *in vivo*. A ineficácia observada pode estar associada também à rigidez da cápsula dessa formulação, que pode ter prolongado a liberação do fármaco no sistema gastrointestinal, diminuindo a concentração de PZQ absorvido pelo intestino do animal e, conseqüentemente, a ação no medicamento nos vermes adultos. Não foi apresentada nenhuma informação na literatura que demonstre alguma ação biológica desse polímero em estudos *in vivo* ou *in vitro*, porém serão necessários estudos complementares para verificar se o Eudragit® E é realmente inerte em componentes biológicos.

O fígado possui um papel importante na infecção esquistossomótica pois ele é o local de amadurecimento do esquistossômulo para sua forma adulta (Wilson 2009). Além disso, a formação de granulomas periovulares no fígado induzido pela resposta imune do hospedeiro definitivo em resposta a presença de ovos de vermes aprisionados nas paredes dos vasos hepáticos e o desenvolvimento de fibrose hepática periportal caracterizam lesões severas ao órgão gerando alterações das enzimas hepáticas (Warren 1982; Wynn et al 2004). Por essa razão, a avaliação da função hepática torna-se extremamente importante para a determinação da eficiência do praziquantel no tratamento da infecção esquistossomótica.

As enzimas hepáticas avaliadas no presente estudo foram utilizadas para indicar possíveis lesões nos hepatócitos e ductos biliares do fígado. O tratamento com o praziquantel nanoencapsulado não gerou alterações significativas nos parâmetros

sorológicos estudados, o que corrobora com vários estudos com nanoformulações (Yang et al. 2009; Mishra et al. 2014; Amara et al. 2018). Porém como o tratamento com essa formulação não foi eficaz na diminuição da carga parasitária dos camundongos infectados, é possível que a capsula tenha sido ineficaz na liberação do praziquantel. Os parâmetros ALT e AST foram os mais sensíveis a apontar diferenças na distribuição de suas concentrações plasmáticas entre os grupos experimentais e os mais utilizados como indicadores de lesões hepáticas na literatura (Jatsa et al 2015; Elhenawy et al 2017). A diferença observada entre os resultados de ALT dos animais apenas tratados com praziquantel (TRAT-PZQ-L e TRAT-PZQ-N) em 15 dias de observação, indicaram um aumento da concentração plasmática dessa enzima no grupo tratado com praziquantel livre, o que corrobora com a ineficácia do tratamento com a formulação nanoencapsulada. Ao analisarmos os resultados do parâmetro AST, houve diferença entre as concentrações apenas entre no grupo de animais tratados com praziquantel livre (TRAT-PZQ-L) com 30 e 60 dias de observação. Não foram encontradas referências na literatura que possam explicar essa diferença, mas podemos relacionar com a recuperação de células hepáticas após a lise celular influenciada pela ação medicamentosa.

O efeito mais significativo nas alterações das enzimas hepáticas foi observado nos grupos infectados com *S. mansoni* sem qualquer tratamento, em três momentos de observação pós-infecção: 15, 30 e 60 dias. Resultados similares foram descritos na literatura (Couto et al 2008; Li-zhi et al 2015; Elhenawy et al 2017).

De acordo com Wilson (2009) a partir do 4º dia de infecção já é possível encontrar vermes jovens no fígado, perdurando até o 20º / 22º dia de infecção até que esses vermes completem seu processo de amadurecimento e se transformem em vermes adultos. Por volta do 40º já é possível observar ovos nas fezes do animal parasitado e, conseqüentemente, podem ser observados granulomas periovulares no fígado. Essas movimentações dos vermes jovens e adultos de *S. mansoni* geram impactos no fígado e, conseqüentemente, nas alterações das enzimas hepáticas.

A utilização do praziquantel como controle para a morbidade da esquistossomose é uma das ações presente nas diretrizes técnicas do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde 2014) e na resolução WHA 65.21 que compõe o plano estratégico para a eliminação da Esquistossomose como um problema de saúde pública até 2025 (WHO 2013). Por se tratar de um medicamento de baixo custo e com produção dentro do território brasileiro (FARMANGUINHOS/FIOCRUZ), seu acesso é

mais facilitado e a demanda de distribuição do medicamento é realizada a partir das Secretarias de Saúde de cada estado.

De acordo com as análises dos dados das plataformas SISPCE/DATASUS/MS SINAN/MS, a taxa de positividade da esquistossomose no Brasil vem diminuindo ao longo dos anos (14, 3% de redução entre os anos de 2008 e 2016) provavelmente influenciada pelas medidas de controle implementadas nos estados endêmicos, incluindo o diagnóstico através de inquéritos coproscópicos bianuais e o tratamento com praziquantel da população infectada. Porém, como essas ações são implementadas apenas em algumas localidades endêmicas, a população atingida pelo programa de controle da esquistossomose não pode ser considerada representativa do Brasil, requerendo, assim, cuidado na análise e extrapolação dos resultados obtidos (Ministério da Saúde 2018).

Conforme resultados apresentados no presente estudo e na literatura (Becher et al. 1980; Mehlhorn et al. 1981; Mehlhorn et al. 1981; Cioli et al.1995), o praziquantel é eficaz no tratamento da esquistossomose mansônica no período patente da infecção, ou seja, quando os vermes de *S. mansoni* já atingiram a fase adulta. Também ficou evidenciado que, apesar de não tratar a infecção na fase pré-patente, as formulações de praziquantel reduziram a carga parasitária em camundongos tratados com 15 e 30 dias de infecção. No tratamento com Praziquantel livre, houve redução da quantidade de ovos por fezes de camundongos de 70,1% e 67,2%, respectivamente, nos grupos tratados após 15 e 30 dias de infecção, enquanto no tratamento com o Praziquantel nanoencapsulado a redução foi de 26,5% e 11,4%, respectivamente, nos grupos tratados após o mesmo período. Hegazy e colaboradores (2018), obtiveram resultados similares em um estudo avaliando a eficácia da terapia combinada do artesunato com o praziquantel. O grupo tratado apenas com praziquantel no período pré-patente (3 semanas) apresentou uma redução de 42,7% na carga parasitária, 37,2% da quantidade de vermes adultos e 38,5% no oograma, em relação ao grupo controle infectado com *S. mansoni*.

## 6 PERSPECTIVAS

Com a finalidade de dar continuidade ao presente estudo, e aprimorar os resultados obtidos, pretendemos continuar as análises das duas formulações farmacêuticas em relação a outras questões da infecção esquistossomótica. Estes experimentos serão realizados como parte do meu doutoramento. A principal pergunta que permeia essa necessidade é se o PZQ-N é realmente ineficaz no tratamento da infecção esquistossomótica. Entre as análises futuras propostas estão: 1) Avaliação da quantidade de adultos encontrados em animais infectados com *S. mansoni* e posteriormente e tratados com PZQ-N; 2) análise histológica das lâminas de cortes do fígado, baço e intestino grosso dos animais infectados com *S. mansoni* e posteriormente tratados com PZQ-N; 3) avaliação de possíveis alterações morfológicas do verme adulto através de análise de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET); 4) experimento *in vitro* de vermes adultos e formas imaturas do *S. mansoni* em solução contendo suspensão de PZQ-N e 5) possíveis alterações no perfil proteômico do parasito e em consequência provocando um efeito epigenético positivo, aumentando a oviposição das fêmeas, o que explicaria a quantidade maior de ovos por grama de fezes após o tratamento. Estes dados complementariam os estudos com PZQ-N e poderiam servir como proposta de diretriz protocolar para futuros testes com medicamentos para esquistossomose.

Durante a execução do projeto apresentado foram realizados experimentos paralelos como:

- a) A coleta de órgãos de animais infectados por *S. mansoni* e tratados posteriormente com ambas formulações do Praziquantel (PZQ-N e PZQ-L). Esses órgãos estão preservados em solução de Formalina Millionig de Carson.
- b) Perfusão dos animais infectados e tratados com ambas formulações do Praziquantel (PZQ-N e PZQ-L). Durante esse procedimento foram retirados os vermes adultos do mesentério e, após a separação do casal em solução PBS, estes foram preservados na solução Karnovsky para análise na microscopia eletrônica (MEV e MET).

Mais estudos são necessários para avaliar as rotas de ação da formulação nanoencapsulada em todas as fases do ciclo de *Schistosoma mansoni*.

## 7 CONCLUSÕES

i) Nesse estudo, as formulações contendo praziquantel reduziram a carga parasitária de camundongos infectados no período pré-patente, indicando uma possível ação do fármaco na fase jovem de *S. mansoni*;

ii) O tratamento com ambas formulações não gerou alterações significativas nos parâmetros sorológicos estudados, corroborando com a literatura;

iii) A formulação nanoencapsulada do praziquantel utilizada nesse estudo não foi eficaz como uma terapia alternativa para o tratamento da esquistossomose mansônica;

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdulla MH, Lim KC, Sajid M, Mckerrow JH, Caffrey CR. Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. PLoS Med. 2007;4(1):e14.

Araújo N, Souza CP, Passos LKJ, Simpson AJG, Neto ED, Pereira TR et al. Suscetibilidade aos agentes quimioterápicos de isolados de *Schistosoma mansoni* oriundos de pacientes tratados com oxamniquine e praziquantel e não curados. Rev Soc Bras Med Trop. 1996; 29(5): 467-76.

Amara RO, Ramadan AA, El-Moslemany RM, Eissa MM, El-Azzouni MZ, El-Khordagui LK. Praziquantel-lipid nanocapsules: an oral nanotherapeutic with potential *Schistosoma mansoni* tegumental targeting. Int J Nanomedicine. 2018; 13:4493-505.

Barbosa CS, Souza ATOF, Leal NOB, Gomes ECS, Araujo KCGM, Guimarães RJPS. Turismo de risco para esquistossomose mansônica em Porto de Galinhas, Estado de Pernambuco, Brasil. Rev Pan-Amaz Saude. 2015; 6(3):51-8.

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(2):113–28.

Bergquist NR, Leonardo LR, Mitchell GF. Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? Trends Parasitol. 2005; 21(3):112-7.

Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. Schistosoma mansoni e esquistossomose: uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ; 2008.

Campos FS. Desenvolvimento de Hidrogéis de Dextrano contendo Praziquantel. Araraquara. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] – Universidade Estadual Paulista; 2009.

Castro N, Medina R, Sotelo J, Jung H. Bioavailability of Praziquantel Increases with Concomitant Administration of Food. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(10):2903-4.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention [homepage na internet]. Schistosomiasis [acesso em 13 out 2018]. Disponível em: [https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/gen\\_info/faqs.html](https://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/gen_info/faqs.html)

Chellampillai B, Pawar A P. Improved bioavailability of orally administered andrographolide from pH-sensitive nanoparticles. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 2011; 35(3-4):123-9.

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: S3-S9.

Cioli D. Chemoterapy of schistosomiasis: an update. *Parasitology Today.* 1998; 14:418-22.

Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH. Human schistosomiasis. *Lancet.* 2014; 383(9936):2253–64.

Couto FFB, Coelho PMZ, Araújo N, Kusel JR, Katz N, Jannotti-Passos LK et al. *Schistosoma mansoni*: a method for inducing resistance to praziquantel using infect *Biomphalaria glabrata* snails. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011; 106(2): 153-7.

Couto JLA, Vieira RCS, Barbosa JM, Machado SS, Ferreira HS. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(4):390-3.

DATASUS - PCE [homepage na internet]. Informações de Saúde: Epidemiológicas e Morbidade [acesso em 01 set 2018]. Disponível em: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=30314472>.

Dai J, Nagai T, Wang X et al. pH-sensitive nanoparticles for improving the oral bioavailability of cyclosporine. *A Int J Pharm.* 2004; 280:229-40.

Davis A, Biles JE, Ulrich AM. Initial experiences with praziquantel in the treatment of human infections due to *Schistosoma haematobium*. *Bull World Health Organ.* 1979; 57(5):773-9.

Dias LC et al. A human strain of *Schistosoma mansoni* resistant to schistosomicides. *Rev. Saúde Pública.* 1978; 12: 110.

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(6):947-51

Elhenawy AA, Ashour RH, Nabih N, Shalaby NM, El-Karef AA, Abou-El-Wafa HS. Insulin growth factor inhibitor as a potential new anti-schistosoma drug: An in vivo experimental study. *Biomed Pharmacother.* 2017; 95:1346-58.

e-SIC: Sistema Eletrônico do serviço de Informação ao Cidadão [homepage na internet]. Versão 3.0.5 [acesso em 01 dez 2018]. Disponível em: <https://esic.cgu.gov.br/sistema/site/index.aspx>.

Falcão EC. Pirajá da Silva: o inconstestável descobridos do *Schistosoma mansoni*. 2ª edição. Brasília: Ministério da Saúde; 2008.

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; 51:83-8.

Farias BV. Avaliação Do Equilíbrio de Adsorção e Projeto de Condições de Separação de Praziquantel por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Fortaleza. Dissertação [Mestrado em Engenharia Química] – Universidade Federal do Ceará; 2013.

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.

Fonseca LB, Viçosa AL, Mattos ACA, Coelho PMZ, Araújo N, Zamith HPS, Volpato NM, Nele M, Pinto JCCS. Development of a brazilian nanoencapsulated drug for schistosomiasis treatment. *Vigil Sanitária Debate*. 2013a; 1:82–88.

Fonseca LB, Nelem M, Volpato NM, Seiceira RC, Pinto JC. Production of PMMA nanoparticles loaded with praziquantel through in situ miniemulsion polymerization. *Macromol React*. 2013b; 7:54–63.

Frohberg H. Results of toxicological studies on praziquantel. *Arzneimittelforschung*. 1984; 34(9b):1137–44.

Greenberg RM. Are Ca<sup>2+</sup> channels targets of praziquantel action? *Int J Parasitol*. 2005; 35:1–9.

Harnett W, Kusel JR. Increased exposure of parasite antigens at the surface of adult male *Schistosoma mansoni* exposed to praziquantel in vitro. *Parasitology*. 1986; 93(Pt 2):401-5.

Hegazy LAM, Motiam MHA, Abd El-Aal NF, Ibrahim SM, Mohamed HK. Evaluation of Artesunate and Praziquantel Combination Therapy in Murine Schistosomiasis mansoni. *Iran J Parasitol*. 2018; 13(2):193-203.

Herrera LA, Ostrosky-Wegman P, Montero R, Rojas E, Gonsebatt ME, Schiffmann D. Evaluation of the carcinogenic and genotoxic potential of praziquantel in the Syrian hamster embryo cell transformation assay. *Mutat Res*. 1994; 305(2):175–180

Homeida M, Leahy W, Copeland S, Ali MM, Harron DW. Pharmacokinetic interaction between praziquantel and albendazole in Sudanese men. *Ann. Trop. Med. Parasitol*. 1994; 88(5):551–9.

IBM. SPSS statistics for Windows. Version 24.0. Armonk, NY: IBM; 2016.

Inobaya MT, Olveda RM, Chau TN, Olveda DU, Ross AGP. Prevention and control of schistosomiasis: a current perspective. *Res Rep Trop Med*. 2014; 2014(5):65-75.

Ishizaki T, Kamo E & Boehme K. Double-blind studies of tolerance to praziquantel in Japanese patients with *Schistosoma japonicum* infections. *Bull. WHO*. 1979;57(5):787-791.

Islan GA, Durán M, Cacicedoa ML, Nakazatod G, Kobayashi RKT, Martinez DST, Castro GR, Durán N. Nanopharmaceuticals as a solution to neglected diseases: Is it possible? *Acta Tropica*. 2017; 170:16–42.

Jatsa HB, Kenfack CM, Simo DN, et al. Schistosomicidal, hepatoprotective and antioxidant activities of the methanolic fraction from *Clerodendrum umbellatum* Poir leaves aqueous extract in *Schistosoma mansoni* infection in mice. *BMC Complement Altern Med*. 2015; 15:248.

Jung JY, Yoo SD, Lee SH, Kim KH, Yoon DS, Lee KH. Enhanced solubility and dissolution rate of itraconazole by a solid dispersion technique. *Int J Pharm*. 1999;187:209–218.

Kabatereine N, Kemijumbi J, Ouma J, Kariuki H, Richter J, Kadzo H, et al. Epidemiology and morbidity of *Schistosoma mansoni* infection in a fishing community along Lake Albert in Uganda. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2004; 98(12):711–8.

Katz N et al. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. *Rev Inst Med Trop. S. Paulo*. 1972; 14:397-400.

Katz N. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses. Belo Horizonte: CPqRR, 2018. (Ministério da Saúde. Série Esquistossomose-17).

Katz N, Rocha RS, Chaves A. Preliminary trials with praziquantel in human infections due to *Schistosoma mansoni*. *Bull World Health Organ*. 1979. 57:781-5.

King CH, Dickman K, Tisch DJ. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. *Lancet*. 2005; 365(9470):1561–9.

Kolenyak-Santos F, Garnero C, de Oliveira RN, de Souza AL, Chorilli M, Allegretti SM, Longhi MR, Chaud MV, Gremião MP. Nanostructured Lipid Carriers as a Strategy to Improve the In Vitro Schistosomiasis Activity of Praziquantel. *J Nanosci Nanotechnol*. 2015; 15(1):761-72.

Ismail MM, Taha SA, Farghaly AM, el-Azony AS. Laboratory induced resistance to praziquantel in experimental schistosomiasis. *J Egypt Soc Parasitol*. 1994; 24:685-695.

Kohn AB, Anderson PAV, Robert-Misterly JM & Greenberg RM. Schistosome calcium channel  $\beta$  subunits: unusual modulatory effects and potential role in the action of the antischistosomal drug praziquantel. *J Biol Chem*. 2001; 276:36873-6.

Kramers PGN, Gentile JM, Gryseels BJM, Jordan P, Katz N, Mott KE, Mulvihill JJ, Seed JL, Froberg H. Review of the genotoxicity and carcinogenicity of antischistosomal drugs; is there a case for a study of mutation epidemiology? Report of a task group on mutagenic antischistosomals. *Mutat Res*. 1991; 257(1):49–89.

Kumari A, Singla R, Guliani A, Yadav SK. Nanoencapsulation for drug delivery. *EXCLI Journal* 2014; 13:265-286

Lambertucci JR, Serufo JC, Gerspacher-Lara R, Rayes AA, Teixeira R, Nobre V, Antunes CM. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta Trop*. 2000; 77(1):101-9.

Leopold G, Ungethum W, Groll E, Diekmann HW, Nowak H, Wegner DH. Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes. An example of a complex study covering both tolerance and pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol*. 1978; 14(4):281–91.

Li-zhi W, Xin-Sheng Z, Jiang-shan D, Yi W, Bao-an Y. Transdermal praziquantel administration attenuates hepatic granulomatosis in mice infected with *Schistosoma japonicum*. Parasitol Res. 2015 ;114(4):1417-24.

Lim BG, Tan RBH, Ng, S. C. and Ching, C. B., 1995, Solubility phase diagram of praziquantel enantiomeric system. Chirality. 1995; 7:74-81.

Lima SF, Vieira LQ, Harder A, Kusel JR. Effects of culture and praziquantel on membrane fluidity parameters of adult *Schistosoma mansoni*. Parasitology. 1994; 109(01):57-64.

Mainardes RM, Evangelista RC. Praziquantel-loaded PLGA nanoparticles: preparation and characterization. J Microencapsul. 2005; 22:13-24.

Mandour ME, el Turabi H, Homeida MM, el Sadig T, Ali HM, Bennett JL, Leahey WJ, Harron DW. Pharmacokinetics of praziquantel in healthy volunteers and patients with schistosomiasis. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1990; 84(3):389-93.

MCTIC. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações (Brasil). Resolução Normativa CONCEA nº. 33, de 18 de novembro de 2016. Anexo: Procedimentos – Roedores e Lagomorfos mantidos em instalações de instituições de ensino ou pesquisa científica. Diário Oficial da União 21 nov 2016; Seção 1.

Mehlhorn H, Becker B, Andrews P, Thomas H, Frenkel JK. In vivo and in vitro experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. A light and electron microscopic study. Arzneimittelforschung. 1981; 31(3a):544–54.

Meier H, Blaschke G. Capillary electrophoresis-mass spectrometry, liquid chromatography-mass spectrometry and nanoelectrospray-mass spectrometry of praziquantel metabolites. J Chromatogr Biomed Sci Appl. 2000; 748:221-31.

Meister A, Anderson ME. Glutathione Annu Rev Biochem. 1983; 52:711-60.

Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde: volume 3. Brasília: Ministério da Saúde; 1ª edição, 2017.

Ministério da Saúde. Situação epidemiológica e estratégias de prevenção, controle e eliminação das doenças tropicais negligenciadas no Brasil, 1995 a 2016. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2018; 49(49).

Ministério da Saúde. Vigilância da esquistossomose mansônica: diretrizes técnicas. Brasília: Ministério da Saúde; 4ª edição, 2014.

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(3):321-34.

Mishra A, Swain RK, Mishra SK, Panda N, Sethy K. Growth performance and serum biochemical parameters as affected by nano zinc supplementation in layer chicks. *Indian J Anim Nutr.* 2014; 31:384-8.

Molpeceres J, Guzman M, Aberturas MR, Chacon M, Berges L. Application of central composite designs to the preparation of polycaprolactone nanoparticles by solvent displacement. *J Pharm Sci.* 1996; 85(2): 206–13.

Münster M, Schoch C, Schmidt C, Breitzkreutz J. Multiparticulate system combining taste masking and immediate release properties for the aversive compound praziquantel. *Eur J Pharm Sci.* 2017;109:446-54.

Nascimento GL, Pegado HM, Domingues ALC, Ximenes RAA, Itria A, Cruz LM, Oliveira MRF. The cost of a disease targeted for elimination in Brazil: the case of schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018; 114:e180347.

Olliaro P, Seiler J, Kuesel A, Horton J, Clark JN, Don R et al. Potential drug development candidates for human soil-transmitted helminthiases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(6): e1138.

Oliveira FA, Kusel JR, Ribeiro F, Coelho PM. Responses of the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to treatment with praziquantel and other biomolecules. *Parasitology.* 2006; 132(Pt 3):321-30.

Pax R, Bennett JL, Fetterer R. A benzodiazepine derivative and praziquantel: effects on musculature of *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma japonicum*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 1978; 304(3):309-15.

Peters PA & Warren KS. A rapid method of infecting mice and other laboratory animals with *Schistosoma mansoni*: subcutaneous injection. J. Parasitol. 1969; 55:558.

Quintanar-Guerrero D, Alle´mann E, Fessi H, Doelker E. Pseudolatex preparation using a novel emulsion-diffusion process involving direct displacement of partially water-miscible solvents by distillation. Int J of Pharm. 1999; 188(2):155–64.

R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Version 3.5.2. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2018.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmacologia. Fármacos Antihelmínticos. 4 ed. Ed. Guanabara Koogan, p. 624, 2000.

Reich MR, Govindaraj R. Dilemmas in drug development for tropical diseases. Experiences with praziquantel. Health Policy. 1998; 44(1):1-18.

Reis CP, Neufeld RJ, Ribeiro AJ, Veiga F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. Nanomedicine. 2006; 2(1):8-21.

Ribeiro F, Coelho PMZ, Vieira LQ, Watson DG, Kusel JR. The effect of praziquantel treatment on glutathione concentration in *Schistosoma mansoni*. Parasitology. 1998; 116(3): 229-36.

Roszkowski P, Maurin JK, Czarnocki Z. Enantioselective synthesis of (R)-(-)-praziquantel (PZQ). Tetrahedron Asymmetry. 2006; 17, p. 1415-1419, 2006.

Salam RA, Maredia H, Das JK, Lassi ZS, Bhutta ZA. Community-based interventions for the prevention and control of helminthic neglected tropical diseases. Infect Dis Poverty. 2014;3:23.

Sarvel AK, Oliveira AA, Silva AR, Lima ACL, Katz N. Evaluation of a 25-Year-Program for the Control of Schistosomiasis *Mansoni* in an Endemic Area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5(3):e990.

Sessa G, Weissman G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *J Lipid Res*. 1968; 9(3):310-8.

Seubert J, Pohlke R, Loebich F. Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against schistosomes and cestodes. *Experientia*. 1977;33(8):1036-7.

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

Stelma FF, Talla I, Sow S, Kongs A, Niang M, Polman K, Deelder AM, Gryseels B. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*. 1995; 53(2):167-170.

Suganya V, Anuradha V. Microencapsulation and Nanoencapsulation: A Review. *Int J Phar Clin Res*. 2017; 9(3):233-239

Sun Q, Mao R, Wang D, Hu C, Zheng Y, Sun D. The cytotoxicity study of praziquantel enantiomers. *Drug Des Devel Ther*. 2016; 10:2061–2068.

Svensson CK, Edwards DJ, Mauriello PM, Barde SH, Foster AC, Lanc RA, Middleton E Jr, Lalka D. Effect of food on hepatic blood flow: implications in the “food effect” phenomenon. *Clin Pharmacol Ther*. 1983; 34(3):316–23.

Tang J, Xu N, Ji H, Liu H, Wang Z, Wu L. Eudragit® nanoparticles containing genistein: formulation, development, and bioavailability assessment. *Int J Nanomedicine*. 2011; 6:2429-35.

Taylor M. Global trends in schistosomiasis control. *Bull World Health Organ*. 2008; 86:738.

Thomas H & Gönner R. The efficacy of praziquantel against cestodes in animals. *Z Parasitenkd.* 1977; 52(2):117–27.

Tomar L K, Tyagi C, Lahiri SS, Singh H. Poly (PEGDMA-MMA) copolymeric micro and nanoparticles for oral insulin delivery. *Polymers Advanced Technologies.* 2011; 22: 1760-7.

Uchegbu IF, Schatzlein AG. *Polymers in Drug Delivery. Selecting the Right Polymer for Biomaterial Application.* 1 ed. Ed. CRC Taylor E Francis Group, 2006.

Utzing J, Keiser J, Shuhua X, Tanner M, Singer BH. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2003; 47:1.487-95.

Vale N, Gouveia MJ, Rinaldi G, Brindley PJ, Gärtner F, Correia da Costa JM. Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(5): e02582-16

Vennervald B, Ouma J, Butterworth A. Morbidity in schistosomiasis: assessment, mechanisms and control. *Parasitol Today.* 1998; 14(10):385–90.

Wang SL, Lin SY, Chen TF, Cheng WT. Eudragit E accelerated the diketopiperazine formation of enalapril maleate determined by thermal FTIR microspectroscopic technique. *Pharm Res.* 2004; 11:2127–32.

Warren KS. The Secret of the Immunopathogenesis of Schistosomiasis: IN VIVO Models. *Immunol Rev.* 1982; 61(1):189–213.

Wilson RA. The saga of schistosome migration and attrition. *Parasitology.* 2009;136(12): 1581-92.

Wynn TA, Thompson RW, Cheever AW & Mentink-Kane MM. Immunopathogenesis of schistosomiasis. *Immunol Rev.* 2004; 201(1):156–67.

WHO. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee. Technical Report Series. Geneva: World Health Organization; 2002. Report No.: 912.

WHO. Preventive chemotherapy in human helminthiasis: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions: a manual for health professionals and programme managers. Geneva: World Health Organization; 2006.

WHO. Schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis: numbers of people treated in 2017. Weekly epidemiological record No 50. 2018; 93:681-92.

WHO. Schistosomiasis: progress report 2001 - 2011, strategic plan 2012 - 2020. Geneva: World Health Organization 2013; 1-80.

WHO. The Selection and Use of Essential Medicines. WHO Technical Report Series 1006. 2017; 1-604.

WHO. WHA65.21. Elimination of schistosomiasis. Sixty-fifth World Health Assembly Geneva 21-26 May 2012 Resolutions, decisions and annexes. Geneva: World Health Organization 2012; 36-37.

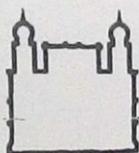
Wu MH, Wei CC, Xu ZY, Yuan HC, Lian WN, Yang QJ et al. Comparison of the therapeutic efficacy and side effects of a single dose of levopraziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of schistosomiasis japonica. Am J Trop Med Hyg 1991; 45:345-9.

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

Yang L, Geng Y, Li H, Zhang Y, You J, Chang Y. Enhancement the oral bioavailability of praziquantel by incorporation into solid lipid nanoparticles. Pharmazie. 2009; 64(2):86-9.

## 9 ANEXOS

### 9.1 Licença CEUA L-016/2015 aprovada



Instituto Oswaldo Cruz  
Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA/ IOC

LICENÇA

L-016/2015

Certificamos que o protocolo (CEUA/IOC-009/2015), intitulado "Avaliação do impacto de novas formulações farmacêuticas e fitoquímicos no ciclo de vida de *Schistosoma mansoni*", sob a responsabilidade de **CLÉLIA CHRISTINA CORRÊA DE MELLO SILVA** atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional. Esta licença tem validade até 31/03/2019 e inclui o uso total de:

**Camundongo, cepa:**

*Swiss albinos* – 1700 animais fêmeas (em 4 anos) – 4 - 6 semanas

**Observação:** Esta licença não substitui outras licenças necessárias, como Certificado de Qualidade em Biossegurança para animais geneticamente modificados, certificado do IBAMA para captura de animais silvestres ou outros.

Rio de Janeiro, 29 de maio de 2015.

Flávio Alves Lara

**Coordenador Adjunto da CEUA/Instituto Oswaldo Cruz  
Fundação Oswaldo Cruz**

FIOCRUZ-Fundação Oswaldo Cruz/IOC-Instituto Oswaldo Cruz  
Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - Rio de Janeiro - RJ - Brasil  
CEP: 21040-360 Tel: (21) 2562-1056