

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ - IOC

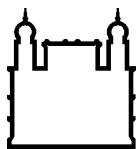
Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA DE UM
ISOLADO MURINO DE *Schistosoma mansoni* AO
PRAZIQUANTEL: UMA ABORDAGEM MORFOLÓGICA E
BIOLÓGICA.**

Michele Costa da Silva

Rio de Janeiro – RJ

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ – IOC

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Michele Costa da Silva

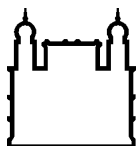
**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA DE UM
ISOLADO MURINO DE *Schistosoma mansoni* AO
PRAZIQUANTEL: UMA ABORDAGEM MORFOLÓGICA E
BIOLÓGICA.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do
título de Doutor em Biologia Parasitária

Orientador: Dr. Arnaldo Maldonado Júnior

Rio de Janeiro – RJ

2011



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ – IOC

Pós-Graduação em Biologia Parasitária

Michele Costa da Silva

AVALIAÇÃO DA RESPOSTA TERAPÊUTICA DE UM ISOLADO MURINO DE

***Schistosoma mansoni* AO PRAZIQUANTEL: UMA ABORDAGEM**

MORFOLÓGICA E BIOLÓGICA.

Orientador: Dr. Arnaldo Maldonado Júnior

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a. Delir Corrêa Gomes Maués da Serra Freire

Prof. Dr. Adauto José Gonçalves de Araújo

Prof. Dr. Jairo Pinheiro da Silva

Prof. Dr. Alexandre dos Santos Pyrrho

Prof. Dr^a. Cláudia Portes Santos Silva

Rio de Janeiro, 20 de dezembro de 2011

Aos meus pais: Maria das Graças Costa da Silva, fortaleza e “graça” de toda família, meu grande exemplo e José Siqueira da Silva por todo apoio e luta.

Aos meus irmãos: Napoleão Luiz Costa da Silva pelo caráter e dedicação, Antônia Jasy Costa da Silva pelo incentivo e ao saudoso José Siqueira da Silva Filho pela alegria inesquecível.

E ao Lucas de Andrade Barros pela parceria e felicidade compartilhada a cada dia.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Oswaldo Cruz pela viabilidade do projeto e pela bolsa concedida durante o tempo de doutoramento.

À UERJ pela minha formação desde a graduação, pela colaboração e pelos amigos conquistados.

Aos professores da Pós-Graduação em Biologia Parasitária - IOC - Fiocruz, pela contribuição para a minha formação.

Aos membros da banca examinadora pelo valiosíssimo tempo dedicado a leitura desta tese e pelas sugestões apresentadas.

Ao Dr. Arnaldo Maldonado Júnior pela orientação, tempo dedicado, pela ajuda imprescindível no trabalho de campo e pelos ensinamentos valiosos.

Ao Dr. José Roberto Machado e Silva pelo incentivo desde a época de iniciação científica, pelas oportunidades oferecidas e pela colaboração inestimável, a minha gratidão e admiração.

À Dra. Rosângela Rodrigues e Silva pela ajuda primordial na elaboração e submissão da licença para a utilização de animais (CEUA), e pela colaboração desde a época do Mestrado.

À Dra. Renata Heisler Neves pela ajuda imprescindível, pela atenção e amizade demonstrada.

Ao mestre Lucas de Andrade Barros, pelo grande incentivo, pela ajuda em experimentos longos e por tornar o dia a dia mais ameno.

À mestre Regina Maria Figueiredo de Oliveira (UERJ), pelas palavras de incentivo, amizade, refinado senso de humor e pelos constantes ensinamentos enriquecedores.

À Dra. Delir Correa Gomes Maués da Serra Freire (IOC- Fiocruz), pelas palavras sempre positivas e incentivadoras.

Aos funcionários e professores da Disciplina de Parasitologia (UERJ) pelo longo e agradável convívio.

À Teresa Cristina Hartje (UERJ) pela amizade, bom humor e pelos inúmeros cafezinhos que fortaleceram os dias difíceis.

À mestre Luciana Brandão pela colaboração no experimento piloto.

Ao doutorando Frederico Wallace Silva Leitão (UERJ) pela ajuda constante na área de informática e pela presença amiga ao longo dos anos.

À doutoranda Alba Cristina Miranda de Barros Alencar (UERJ) pela amizade, pelo valioso incentivo nas horas difíceis e pelo convívio sempre agradável.

À doutoranda Vanessa de Góes (UERJ), pela amizade, companheirismo e por se mostrar sempre disposta a ajudar.

Aos integrantes do Laboratório Romero Lascasas Porto da Disciplina de Parasitologia da Uerj, pelo convívio, companheirismo e ajuda.

Aos integrantes do Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios, em especial ao doutorando Juberlan Silva Garcia e ao técnico André Campos Santana pela ajuda nas necropsias dos animais.

À bióloga Juliana Souza Ferraz pela ajuda em etapa importante do trabalho experimental e pelo carinho demonstrado.

Ao Laboratório Nacional de Referência em Malacologia Médica da Fundação Oswaldo Cruz pelo fornecimento das cercárias do isolado BH.

Ao Dr. Eduardo José Lopes Torres pelo auxílio na análise da microscopia eletrônica de varredura.

Ao Mestre Bernardo Miguel de Oliveira Pascarelli pelo valioso auxílio na Plataforma de microscopia laser confocal, IOC- Fiocruz.

À Patrícia Martinez pelo auxílio na análise da microscopia laser confocal, Uerj.

À Mestre e amiga querida, Carla de Lamare Biolchini Germano Cardoso pela ajuda no experimento piloto e principalmente pelo apoio demonstrado nos momentos difíceis.

Aos meus pais: José Siqueira da Silva e Maria das Graças Costa da Silva pelo afeto, suporte, exemplo e apoio incondicional.

Ao Napoleão Luiz Costa da Silva, meu grande incentivador, por ter cuidado da irmã caçula sempre que foi preciso.

Ao José Siqueira da Silva Filho pelo convívio inesquecível e pelo exemplo de vida.

À Antônia Jasy Costa da Silva, pelo cuidado com os irmãos desde cedo, pela dedicação, afeto e união.

À minha avó Maria Ferreira da Silva pelos 104 anos de exemplo de simplicidade e dignidade.

Ao meu sobrinho Mateus Lages Costa da Silva, alegria e orgulho da madrinha.

À Naiara Santos Lages por ter me dado um sobrinho maravilhoso e por toda torcida.

A todos os meus afilhados: Ivo Lira, Mateus Silva, Lucas Magalhães, Victoria Santos, Victória Silva e Letícia Cardoso por alegrarem a minha vida e pela esperança de um futuro melhor.

À Giselle Magalhães Silva, Jacquelinny Elaine da Silva e Ana Carolina da Silva Alves minhas primas do coração, pela amizade sincera e duradoura.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho (inclusive os roedores silvestres) o meu sincero agradecimento.

*"Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.
Deixam um pouco de si. Levam um pouco de nós."*

(Antoine de Saint Exupéry)

SUMÁRIO

Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Anexos	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Esquistossomose mansônica	1
1.2. Roedores silvestres e esquistossomose mansônica	5
1.3. Isolados de <i>Schistosoma mansoni</i>	7
1.4. Drogas esquistossomicidas	8
2. OBJETIVO GERAL	13
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1. Aprovação do Comitê de Ética	14
3.2. Área de trabalho de campo e isolamento do <i>Schistosoma mansoni</i> de <i>Nectomys squamipes</i>	14
3.3. Hospedeiros e isolados utilizados	16
3.4. Infecção experimental	16
3.5. Esquema terapêutico e grupos experimentais	16
3.6. Recuperação de vermes	17
3.7. Análise por microscopia de campo claro: Estudo morfológico e morfométrico	17
3.8. Análise por microscopia de varredura laser confocal	18
3.9. Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)	18
3.10. Avaliação parasitológica	19
3.11. Oograma intestinal (Estágios de desenvolvimento dos ovos)	19
3.12. Análise estatística dos dados	19
4. RESULTADOS	20
4.1. DADOS PARASITOLÓGICOS	20

4.1.1. Redução da carga de parasitária	20
4.1.2. Eliminação de ovos nas fezes	21
4.1.3. Oograma	22
4.2. ESTUDO MORFOLÓGICO	22
4.2.1. MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO	22
4.2.1.1. Vermes adultos machos do isolado R	22
4.2.1.2. Vermes adultos fêmeas do isolado R	26
4.2.1.3. Vermes adultos machos do isolado BH	26
4.2.1.4. Vermes adultos fêmeas do isolado BH	28
4.2.2. DADOS MORFOMÉTRICOS	29
4.2.2.1. Vermes adultos machos do isolado R	29
4.2.2.2. Vermes adultos fêmeas do isolado R	29
4.2.2.3. Vermes adultos machos do isolado BH	29
4.2.2.4. Análise Morfométrica comparativa: Machos isolado BH x R..	30
4.2.2.5. Vermes adultos fêmeas do isolado BH	30
4.2.2.6. Análise Morfométrica Comparativa: Fêmeas Isolado BH x R..	31
4.3. MICROSCOPIA DE VARREDURA LASER CONFOCAL	32
4.3.1. Vermes adultos machos do isolado R	32
4.3.2. Vermes adultos fêmeas do isolado R	36
4.3.3. Vermes adultos machos do isolado BH	37
4.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	38
4.4.1. Vermes adultos machos do isolado R	42
4.4.2. Vermes adultos fêmeas do isolado R	44
4.4.3. Vermes adultos machos do isolado BH	46
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES	52
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
8. ANEXOS	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo biológico de <i>Schistosoma mansoni</i>	2
Figura 2: Granulomas esquistossomóticos hepáticos corados por HE (hematoxilina e eosina) da fase aguda (A) e crônica (B) da infecção.....	3
Figura 3: Casal de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> corados por Carmim clorídrico.....	4
Figura 4: Ciclo de transmissão de <i>Schistosoma mansoni</i> , com <i>Nectomys squamipes</i> como hospedeiro vertebrado.	6
Figura 5: Fórmula química do praziquantel.	9
Figura 6: Localização do Município de Sumidouro no mapa do estado do Rio de Janeiro.	15
Figura 7: <i>Nectomys squamipes</i> capturado em armadilha guarnecida de touca cirúrgica para recolhimento de fezes do roedor.....	15
Figura 8: Parâmetros morfométricos utilizados no estudo dos vermes adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> corados por Carmim clorídrico.	18
Figura 9: Redução da carga parasitária, isolado R e BH de acordo com a dose administrada de praziquantel.	20
Figura 10: Dinâmica de eliminação de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> nas fezes (Método Kato-Katz) de camundongos albinos tratados com praziquantel (PZQ).....	21
Figura 11: Fotomicrografias do sistema reprodutor e superfície tegumentar de vermes adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> do isolado R tratados com praziquantel, por microscopia de campo claro.....	25
Figura 12: Fotomicrografias do sistema reprodutor e do tegumento de vermes adultos machos de <i>Schistosoma mansoni</i> do isolado BH tratados com 250mg/Kg de PZQ, análise por microscopia de campo claro.....	27
Figura 13: Fotomicrografias por microscopia de varredura laser confocal do sistema reprodutor de vermes adultos machos do isolado R de <i>Schistosoma mansoni</i>	33
Figura 14: Fotomicrografias por microscopia de varredura laser confocal do tegumento de vermes adultos machos do isolado R de <i>Schistosoma mansoni</i>	34

Figura 15: Fotomicrografias por microscopia de varredura laser confocal do sistema reprodutor de vermes adultos fêmeas do isolado R de <i>Schistosoma mansoni</i>	36
Figura 16: Fotomicrografias por microscopia de varredura laser confocal do tegumento de vermes adultos machos do isolado BH de <i>Schistosoma mansoni</i>	38
Figura 17: Fotomicrografias por microscopia de varredura laser confocal do sistema reprodutor de vermes adultos machos do isolado BH de <i>Schistosoma mansoni</i>	40
Figura 18: Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos machos do isolado R de <i>Schistosoma mansoni</i>	43
Figura 19: Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos fêmeas do isolado R de <i>Schistosoma mansoni</i>	45
Figura 20: Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos machos do isolado BH de <i>Schistosoma mansoni</i>	46

LISTA DE TABELAS:

1 - Tabela 1: Análise de parâmetros morfológicos de vermes adultos machos e fêmeas de <i>Schistosoma mansoni</i> do isolado R e BH, recuperados de camundongos albinos tratados com praziquantel.....	24
---	----

ANEXOS

1- Artigo aceito: Revista “Experimental Parasitology”	65
2- “Figure” 1	89
3- “Table” 1	90

RESUMO

O município de Sumidouro é localizado na região serrana do estado do Rio de Janeiro, onde a infecção por *Schistosoma mansoni* tem sido descrita em humanos e em roedores silvestres. A população humana vem sendo submetida a sucessivos programas de controle desde a década de 1950. Vários estudos indicam que o rato d'água (*Nectomys squamipes*) é um reservatório natural de *S. mansoni*, a sua presença em localidades endêmicas, pode prejudicar os programas de controle da esquistossomose. Em condições de laboratório, vermes adultos de *S. mansoni* apresentam plasticidade fenotípica induzida por modificações no microambiente do parasita, principalmente durante a primeira passagem em condições de laboratório. Em nosso estudo, avaliamos o efeito do praziquantel (PZQ) no isolado R, isolado de *N. squamipes* naturalmente infectados, provenientes de Sumidouro, utilizando parâmetros parasitológicos e morfológicos. Os parâmetros parasitológicos (ovos eliminados nas fezes, a redução de vermes adultos e o oograma) foram utilizados para avaliar os efeitos do PZQ no isolado R de *S. mansoni*. Utilizamos também, um isolado de laboratório (isolado BH) como controle. Camundongos infectados com 50 cercárias foram tratados por via oral com PZQ nas seguintes dosagens: 62,5mg/kg (grupo 1), 125mg/kg (grupo 2), 250mg/kg (grupo 3) e 500mg/kg (grupo 4). Cada dose foi dividida em 3 dias (49, 50 e 51 dias pós-infecção). Os dados foram analisados usando o teste estatístico ANOVA. Nos experimentos com o isolado R, não foram observados ovos nas fezes com as doses 250mg/kg e 500mg/kg ($p < 0,05$), enquanto a excreção em BH chegou à zero com todas as doses. A redução da carga parasitária foi significativamente maior ($p < 0,05$) nas duas concentrações maiores testadas de PZQ, independente do isolado. Com 62,5mg/kg, a porcentagem de ovos imaturos variou de 17% (isolado R) à 38% (isolado BH). Na dosagem de 125mg/kg, a porcentagem de ovos imaturos variou de 20% (isolado R) à 16% (isolado BH). Com 250mg/kg, a contagem de ovos imaturos caiu significativamente à 1% (isolado R) e à 4% (isolado BH). Com 500mg/kg, não foram encontrados ovos imaturos no isolado R, enquanto que em BH o valor era de 8%. Nenhuma dosagem afetou, significativamente ($p > 0,05$), a porcentagem de ovos maduros, independente do isolado. Todos os grupos tratados apresentaram um grande aumento na quantidade de ovos mortos, com diferenças significativas ($p < 0,001$) de 62% e 64% nos grupos 3 e 4, respectivamente (isolado R). A porcentagem de ovos mortos subiu de 34% (grupo 1) para 58% (grupo 3) no isolado BH. Embora o grupo 4 tenha mostrado um pequeno aumento na porcentagem de ovos mortos (46%), foi significativamente maior ($p < 0,001$) comparado com os 8% do controle. Os helmintos machos do isolado R (grupos 3 e 4) apresentaram diminuição dos tubérculos. Dos espécimes fêmeas analisados do isolado R, 44% (grupo 3) não apresentaram ovo. O isolado BH, também apresentou diminuição de tubérculos nos helmintos machos (grupos 3 e 4). Os lobos testiculares dos vermes dos grupos tratados apresentaram área e comprimento menor em relação aos helmintos recuperados de camundongos não tratados. Os nossos dados demonstram que o isolado silvestre testado é susceptível ao PZQ.

ABSTRACT

Sumidouro municipality is a mountain region of the Rio de Janeiro state, where natural schistosomiasis mansoni has been described in both human and water rat population. The human population has been submitted to successive control programs since around 1955. A number of studies suggest that water rat (*Nectomys squamipes*) is one natural reservoir of *Schistosoma mansoni*, which may implicate as a confounding factor for control programs of schistosomiasis. Under laboratory conditions, *S. mansoni* adult worms present phenotypic plasticity induced by modifications in the parasite's microenvironment, mainly during the first passage under laboratory conditions. In our study the effects of praziquantel (PZQ) were evaluated on the isolate (R) first isolated from naturally-infected *N. squamipes* from Sumidouro by parasitological and morphological parameters. The therapeutic effects of PZQ against a *S. mansoni* isolate derived from *N. squamipes* (isolate R) and a susceptible isolate (BH) were analyzed in Swiss mice by fecal egg counting, adult worm load and oogram pattern. Infected mice were orally administrated with 62.5mg/kg; 125mg/kg 250mg/kg and 500mg/kg, each dose divided over 3 days (49, 50 and 51 days after infection). The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). In regard to isolate R, no fecal eggs were observed with 250mg/kg and 500mg/kg ($p < 0.05$), whereas BH excretion reached zero with all doses. Mean worm burden reduction was significantly ($p < 0.05$) higher at the two highest concentrations tested of PZQ, regardless of isolate. At 62.5mg/kg, the percentage of immature eggs varied from 17% (isolate R) to 38% (BH isolate). At 125mg/kg, the percentage of immature eggs varied from 20% (isolate R) to 16% (isolate BH). At 250mg/kg, immature eggs dropped significantly to 1% (isolate R) and 4% (isolate BH). At 500mg/kg, no immature eggs were found in isolate R, whereas in BH was 8%. No dosage significantly ($p > 0.05$) affected the percentage of mature eggs, regardless of isolate. There was a large increase in the percentages of dead eggs in all treated groups with significant ($p < 0.001$) increases of 62% and 64% in groups 3 and 4, respectively (isolate R). The percentage of dead eggs rose from 34% (group 1) to 58% (group 3) in isolate BH. Although group 4 showed lowest increase in the percentage of dead eggs (46%), it was significantly higher ($p < 0.001$) compared to the 8% in the control. Male worms from isolate R (groups 3 and 4) showed decrease of the tubercles. In female worms from isolate R, 44% (group 3) showed no egg. The isolate BH also showed decrease of the tubercles in male worms (groups 3 and 4). In general, morphometric values of reproductive system (testicular lobes) specimens grown in treated mice were lower than those of control mice. Our findings indicate that the wild isolate from *N. squamipes* is susceptible to PZQ.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Esquistossomose mansônica:

A esquistossomose humana, causada por *Schistosoma mansoni*, um trematódeo sanguíneo é uma das doenças tropicais negligenciadas transmitidas pela água, mais difundidas (Chitsulo et al., 2000), pois os habitantes dessas regiões têm contato frequente com água contaminada (Sarvel et al., 2011). Essa endemia está relacionada à pobreza e ao baixo desenvolvimento econômico da população, gerando a necessidade de utilização de coleções de água doce contaminada, para o exercício da agricultura, trabalho e lazer (Katz & Peixoto 2000). Esta parasitose é endêmica em 54 países e territórios distribuídos pela América do Sul, Caribe, África e leste do Mediterrâneo, onde atinge as regiões do delta do Nilo e Sudão (Melman et al., 2009).

Acredita-se que as principais espécies do gênero *Schistosoma* que infectam o homem chegaram às Américas através de escravos africanos e imigrantes orientais e asiáticos. Entretanto, somente o *S. mansoni* se instalou no Brasil, devido às condições propícias, tais como a presença de hospedeiros intermediários e condições ambientais semelhantes às das regiões de origem (Melo & Coelho 2004).

As condições de trabalho dos escravos nas plantações explicam, em grande parte, o processo de endemização da esquistossomose mansônica no Brasil. A falta de condições mínimas de higiene, os hábitos de defecar próximo aos rios e riachos e a existência de instalações sanitárias com descarga direta em coleções aquáticas, associados à presença de caramujos susceptíveis à infecção, criaram condições necessárias para que os parasitos transportados pelos escravos pudessem se reproduzir (Camargo, 1980).

No Brasil, a esquistossomose mansônica ocorre em 19 estados, abrangendo uma área endêmica que vai desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais, com focos isolados nos estados do Pará, Piauí, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Goiás, Distrito Federal e Rio Grande do Sul (SVS, 2009). Estima-se que cerca de 2.500.000 a 8.000.000 de brasileiros sejam portadores da doença (SVS, 2009). Entretanto, o conhecimento acerca do comportamento epidemiológico dessa parasitose é limitado, existindo estimativas divergentes sobre sua prevalência no país (Katz & Peixoto 2000)

A transmissão e manutenção da infecção requerem a presença de hospedeiros intermediários (caramujos do gênero *Biomphalaria*) e hospedeiros vertebrados (principalmente o homem), necessários para o completo desenvolvimento do parasito. O *S.*

mansoni possui diferentes estágios de desenvolvimento (vermes adultos, ovos, miracídios, esporocistos, cercárias e esquistossômulos), alternando fases de reprodução sexuada e assexuada.

Os ovos eliminados pelas fezes do hospedeiro vertebrado (geralmente o homem), no meio aquático, liberam os miracídios, os quais infectam os caramujos (hospedeiros invertebrados). Por meio de reprodução assexuada, são formadas diferentes gerações de esporocistos que dão origem a inúmeras cercárias eliminadas na água. Essas penetram pela pele do hospedeiro vertebrado. Após a penetração, as cercárias sofrem alterações morfológicas e fisiológicas e transformam em esquistossômulos, os quais são levados aos pulmões e depois migram para o sistema porta intra-hepático, onde ocorre a maturação dos vermes para posterior acasalamento. Em seguida, os vermes migram para as veias mesentéricas onde ocorre a postura de ovos. Esses têm uma importância epidemiológica quando, alcançam a luz intestinal e são eliminados juntamente com as fezes (Figura 1).

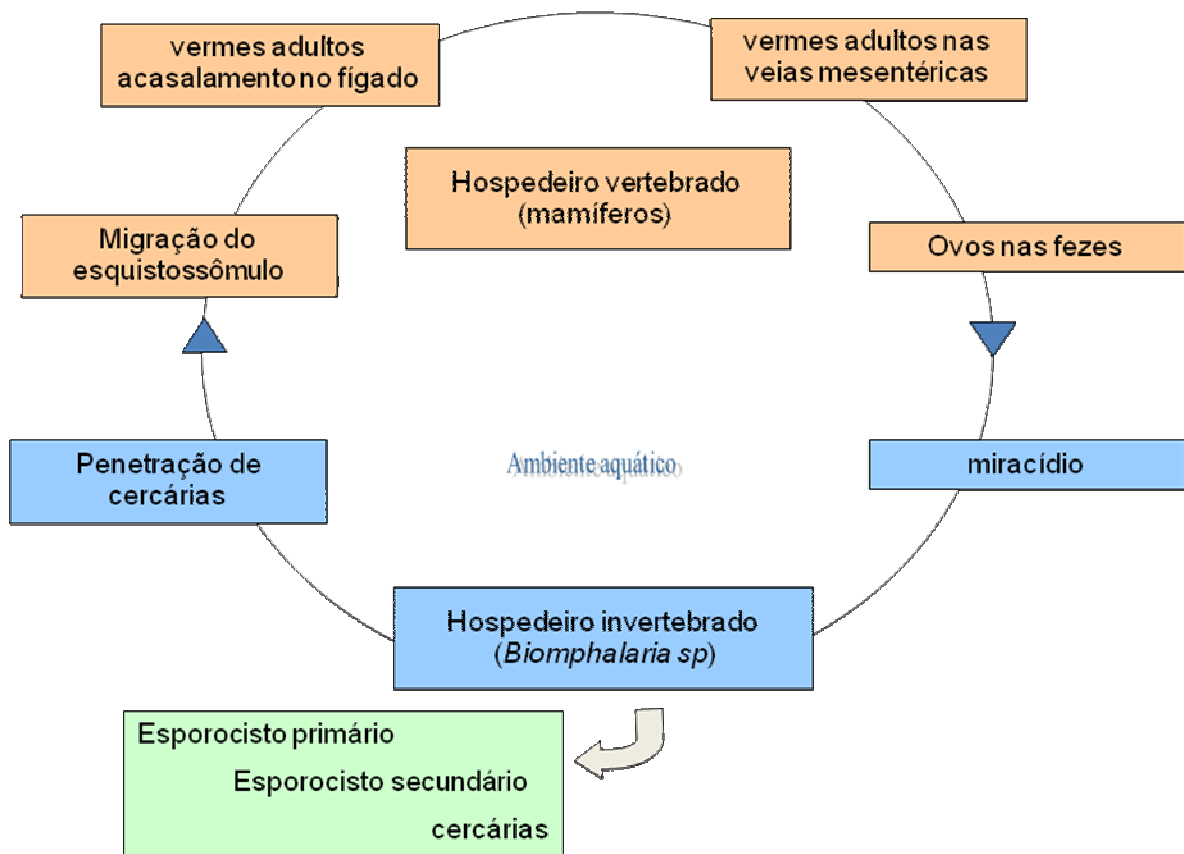


Figura 1: Ciclo biológico de *Schistosoma mansoni*. Fonte: Laboratório Romero Lascasas Porto - UERJ

Outra parte dos ovos fica retida em vários órgãos (parede intestinal, fígado, pâncreas, pulmões e outros), provocando uma reação inflamatória característica, chamada de reação granulomatosa ou granuloma. O granuloma esquistossomótico é uma coleção compacta e organizada de células migrantes, que junto com as células do órgão afetado, dispõem-se em meio a componentes de uma matriz extracelular heterogênea, formando uma estrutura esférica, que circunda cada ovo individualmente. O ovo é o agente granulomatoso, visto que é capaz de provocar a reação granulomatosa por liberação, para o tecido adjacente, de vários componentes próprios, em geral glicoproteínas (Lenzi et al., 2008). O miracídio, forma larval que está no interior do ovo, tem uma vida média em torno de 21 dias (Prata, 1957). Portanto, o granuloma esquistossomótico é uma estrutura dinâmica, que tem fases de amadurecimento que são caracterizadas morfológicamente através de seus componentes celulares. Neste caso, na fase aguda da infecção (Figura 2A) esquistossomótica, os granulomas se apresentam na fase exsudativa (estruturas grandes, com grande quantidade de células ao redor do ovo) com o passar do tempo os granulomas vão sofrendo uma modulação e na fase crônica, essas estruturas se organizam de forma a se apresentarem menores e com constituintes diferentes da fase inicial (Figura 2 B).

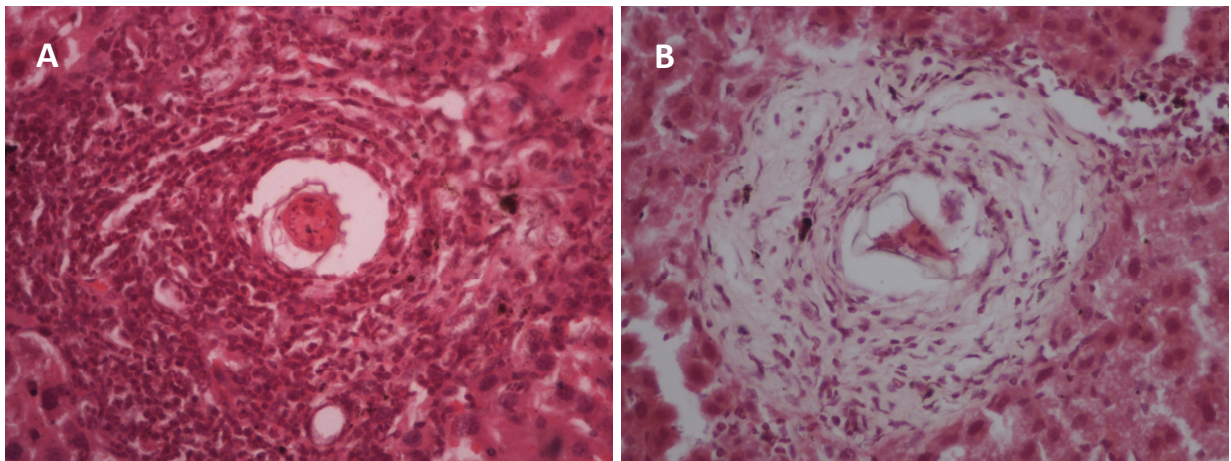


Figura 2: Granulomas esquistossomóticos hepáticos corados por HE (hematoxilia e eosina) da fase aguda (A) e crônica (B) da infecção. Fonte: Laboratório Romero Lascasas Porto – UERJ.

Os vermes adultos apresentam duas ventosas na região anterior do corpo: uma oral e outra ventral. O macho adulto é alongado, mede 0,6 a 1,4 cm de comprimento e abaixo do acetábulo (ventosa ventral) seu corpo se apresenta mais largo e achatado, com as margens curvadas ventralmente formando o canal ginecóforo que envolve a fêmea (Figura 3). Esta é cilíndrica, mais longa e mais fina que o macho medindo 1,2 a 1,6 cm de comprimento (Kastner et al.,1975).

O aparelho genital masculino compreende um único testículo dividido em 6 a 8 lóbulos testiculares, situados dorsalmente no início do canal ginecóforo. O canal deferente dilata-se para constituir um reservatório (vesícula seminal) que se abre para o exterior através de um poro genital (Kastner et al., 1975).

O aparelho genital feminino compreende um ovário oblongo situado na metade anterior do corpo. Um oviduto curto conduz oócitos do ovário ao oótipo, que se continua com o tubo uterino. O poro genital feminino abre-se ventralmente pouco atrás do acetábulo. Os dois terços posteriores do corpo estão ocupados pelas glândulas vitelogênicas cujo canal sinuoso se une ao oviduto pouco antes deste alcançar o oótipo, para aí formar o ovo (Rey, 2008).

No tegumento de vermes machos são encontrados tubérculos e protuberâncias, exceto na região anterior e no final da região posterior. Já a superfície das fêmeas não apresenta protuberâncias (Kastner et al., 1975).



Figura 3: Casal de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* corados por Carmim clorídrico.
Fonte: Laboratório Romero Lascasas Porto – UERJ.

1.2. Roedores silvestres e esquistossomose mansônica

Embora *S. mansoni* seja primariamente um parasito de humanos, outros primatas (Nelson 1960, Standley et al., 2011), bovinos (Barbosa et al., 1962, Modena et al., 2008) e roedores podem servir como hospedeiros vertebrados (Théron & Pointier 1992, Alarcón de Noya et al., 1997). Os primeiros registros de pequenos mamíferos naturalmente infectados por *S. mansoni* na região Neotropical, datam da década de 50 (Amorim, 1953). Desde então, numerosas publicações ampliaram esse conhecimento (Théron et al., 1978, Théron et al., 1984, Combes 1990, Picot 1992, Théron et al., 1992, Alarcón de Noya et al., 1997, Morand et al., 1999). Esses achados acrescentam um fator complicador às estratégias de controle da doença, já que estes hospedeiros atuam como fontes de infecção potencial do *S. mansoni*.

No Brasil, devido a seus hábitos semi-aquáticos e suscetibilidade à infecção natural, esse papel pode ser desempenhado por espécies dos gêneros *Nectomys* e *Holochilus*, ambos pertencentes à família Sigmodontinae (Rey, 1993).

Ainda durante a década de 50, se verificou que o município de Sumidouro (região serrana do estado do Rio de Janeiro), é uma área de transmissão da esquistossomose humana. Desde essa data, a população local vem recebendo tratamento com diferentes esquistossomicidas: etrenol, oxamniquine e posteriormente praziquantel, o que, no entanto não resultou em extinção da transmissão da parasitose. Também, tem-se verificado a presença do rato d'água (*N. squamipes*) como o principal hospedeiro não humano infectado pelo *S. mansoni* nesta mesma região. A infecção natural do roedor tem sido relacionada às suas características biológicas e comportamentais favoráveis, tais como: habitar as margens de cursos d'água e todos os tipos de ambientes inundados, próximo de onde constrói seus ninhos e habitar, frequentemente, áreas de peri-domicílio (D'Andrea et al., 2002) (Figura 4).

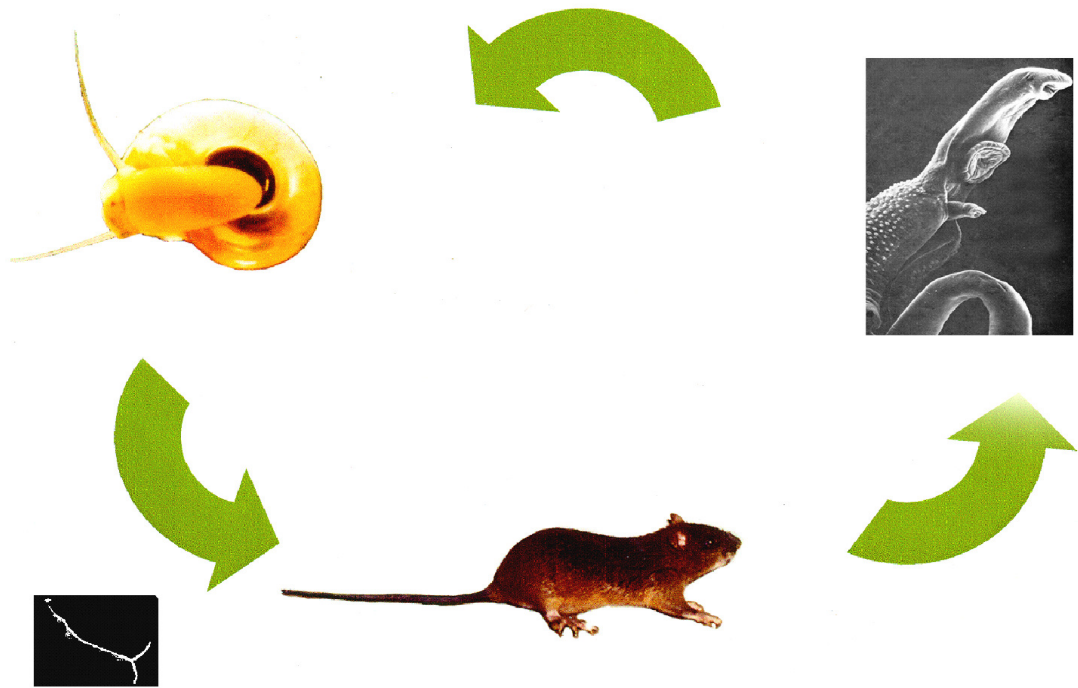


Figura 4: Ciclo de transmissão de *Schistosoma mansoni*, com *Nectomys squamipes* como hospedeiro vertebrado. Fonte: Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios – IOC.

Nectomys squamipes apresenta vasta distribuição geográfica (habitam formações florestais da Mata Atlântica e da Floresta Amazônica e as matas de galeria do Cerrado e Caatinga). No Brasil ocorre do estado de Pernambuco ao Rio Grande do Sul, e em parte dos estados de Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul. A sua presença foi registrada na Argentina e provavelmente no Uruguai (Bonvicino et al., 2002). Além disso, *N. squamipes* possui capacidade de reproduzir o ciclo da esquistossomose em condições semi-naturais (Antunes et al., 1971), eliminando ovos viáveis do parasito nas fezes durante toda a sua vida (Rey, 1993) e boa tolerância à infecção com pouco comprometimento patológico (Rodrigues-Silva et al., 1992, Costa-Silva et al., 2002)

No município de Sumidouro, há indicações de que a transmissão possa ocorrer em ciclos independentes, onde o parasito circula somente entre humanos ou roedores, visto que os níveis de infecção esquistossomótica do *N. squamipes* não se alteraram, mesmo que a população humana local fosse tratada (Carvalho, 1982). Em estudo posterior, da dinâmica de transmissão da parasitose verificou-se que a prevalência da esquistossomose nos roedores alcançou até 57%, enquanto nos humanos oscila entre 5 e 15% (D'Andrea et al., 2000). Após anos seguidos de pesquisas na região, verificou-se que a dinâmica de transmissão da

esquistossomose varia entre as localidades. Sabe-se, por exemplo, que espécimes de *N. squamipes* utilizados como hospedeiros sentinelas infectaram-se tanto ao entardecer quanto no período noturno (D'Andrea et al., 2002), indicando a presença de adaptação do ritmo circadiano de eliminação de cercárias por *Biomphalaria glabrata* da região à biologia dos roedores.

Em condições de laboratório, *N. squamipes* tem sido empregado como modelo alternativo nos estudos da relação parasito-hospedeiro na esquistossomose mansônica experimental (Souza et al., 1992, Maldonado Jr. et al., 1994, Ribeiro et al., 1998). Esse roedor é suscetível a diferentes cepas do parasito (Martinez 1998), os vermes se desenvolvem como em hospedeiros permissivos (Machado-Silva et al., 1997), mas sofrem modificações morfológicas nesse hospedeiro (Neves et al., 2004), indicando pressão seletiva (plasticidade fenotípica). Esse aspecto é relevante, a se considerar que não há comprometimento do comportamento biológico do helminto (Martinez, 1998). Entende-se a produção desses indivíduos como fenótipos adaptativos que aumentam a sua chance de transmissão (Davies & McKerrow 2003). Os estudos realizados em roedores naturalmente ou experimentalmente infectados têm demonstrado que os granulomas hepáticos modulam de forma a produzirem reações menores do que aqueles observados em camundongos (Rodrigues-Silva et al., 1992, Lenzi et al., 1995, Costa-Silva et al., 2002), além de não apresentar resistência a reinfeções em condições de laboratório (Maldonado Jr et al., 1994).

1.3. Isolados de *Schistosoma mansoni*

O intenso fluxo migratório da população humana para ambientes com precárias condições de vida e o processo crescente de adaptação do parasito a diversas populações de hospedeiros invertebrados (Paraense & Corrêa 1978) e de pequenos mamíferos (Amorim, 1953), assim como a origem a partir de diversos pontos do continente africano, contribuiu para o estabelecimento e adaptação de variedades intra-específicas do *S. mansoni* e sua dispersão. Desde a sua introdução na América do Sul, *S. mansoni* divergiu, geneticamente de suas linhagens originais, como a grande afinidade aos roedores silvestres (Combes, 1990).

Ensaio em animais de laboratório confirmam a existência de variedades intra-específicas do *S. mansoni*: a linhagem BH (Belo Horizonte) tem maior capacidade infectante (Magalhães & Carvalho 1976), produz maior número de granulomas, sendo mais patogênica do que a linhagem SJ (São José dos Campos) linhagem isolada de roedores (Magalhães et al., 1975).

A compatibilidade entre isolados de *S. mansoni* de roedores e humanos obtido no município de Sumidouro com algumas espécies de *Biomphalaria* mostraram que na linhagem de roedor, o período pré-cercariano (Freire, 1987) e a mortalidade dos moluscos, são menores que na linhagem humana (Machado-Silva 1981, Freire 1987). Tem sido observado ainda, que as cercárias apresentam uma cinética de eliminação (ritmo circadiano) relacionada ao hospedeiro vertebrado da qual se originaram, ou seja, matutino para uma amostra humana e vespertino para a amostra de roedor (Machado-Silva, 1981). Por outro lado, aspectos morfológicos entre as cercárias de ambos os isolados, assim como a biologia do verme adulto em camundongos, não apresentaram diferenças, configurando uma anfixenose local (Freire et al., 2002, 2003). Apesar disso, os vermes adultos apresentam diferenças morfométricas (Neves et al., 1998).

1.4. Drogas esquistossomicidas

Nas últimas décadas, o oxamniquine foi o medicamento de escolha para o tratamento da esquistossomose mansônica, devido a sua eficácia (Ferrari et al., 2003). Entretanto, o reconhecimento de menor eficiência sobre as formas imaturas e os vermes adultos fêmeas do *S. mansoni*, limitou o sucesso terapêutico com essa droga. Posteriormente, diversos autores verificaram acentuada diminuição da eficácia da droga, o que sugeriu a existência de populações resistentes a oxamniquine (Katz et al., 1973, Dias et al., 1978, Coelho et al., 1997, Conceição et al., 2000).

O praziquantel (PZQ) (Figura 5) é uma droga cujo efeito antiparasitário foi reconhecido nos anos 70 (Gonnert & Andrews 1977); sendo uma mistura racêmica, constituída dos isômeros levógiro e dextrógiro, o enantiômero (-), levógiro, é a única forma com atividade esquistossomicida reconhecida *in vivo* e *in vitro* (Andrews et al., 1983; Xiao et al., 2009). Atualmente, é a droga mais utilizada para o tratamento da infecção humana (Cioli & Pica-Mattoccia 2003). Embora a Organização Mundial de Saúde preconize o emprego desse esquistossomicida em larga escala, com o objetivo de reduzir a morbidade da infecção esquistossomótica ou entre escolares de 7 a 14 anos por serem a fração da população mais importante sob o ponto de vista epidemiológico, há uma grande preocupação com a resistência.

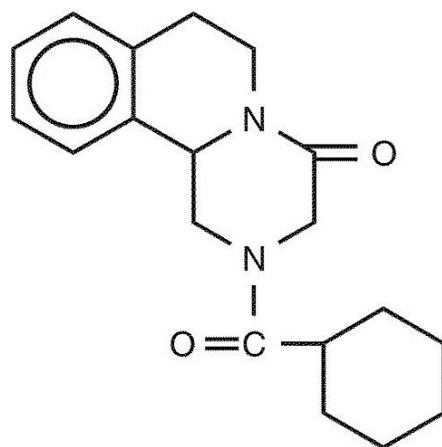


Figura 5. Fórmula química do praziquantel.

Quanto ao sítio de ação da droga, considera-se que produza paralisia da musculatura e vacuolização do tegumento dos vermes (Cioli & Pica-Mattocchia, 2003). O PZQ desregula os mecanismos que controlam o fluxo de cátions, através das membranas celulares dos vermes, inibindo as enzimas que mantêm os gradientes de íons inorgânicos. Estimula a entrada de sódio e inibe a de potássio, ocasionando despolarização nas células do parasito. Além disso, ativa de maneira direta ou indireta a contração cálcio-dependente da musculatura do parasito, devido ao rápido aumento da passagem de cálcio para o interior do parasito, com elevação do tônus muscular. Isso ocasiona forte contração muscular que imobiliza o verme logo após o seu contato com o fármaco. Como conseqüência, os helmintos deixam de se fixar e são rapidamente deslocados das veias mesentéricas para o fígado (Novaes et al., 1999). A alteração do tegumento do parasito revela antígenos, não expostos na superfície do verme tornando-o alvo do sistema imunológico do hospedeiro (Ribeiro et al., 2004).

A dose letal (DL_{50}) para vermes adultos foi estimada *in vivo* para nove isolados diferentes (considerados susceptíveis e resistentes) de *S. mansoni* em estudo multicêntrico em três laboratórios de diferentes países, onde foram utilizados protocolos pré-estabelecidos. Todos os isolados susceptíveis ao PZQ apresentaram DL_{50} menor que 100mg/kg de peso corporal, ao passo que os isolados considerados resistentes apresentaram uma DL_{50} maior que 100mg/kg de peso corporal (Cioli et al., 2004). Os protocolos utilizados para estabelecer a DL_{50} podem ser utilizados para estabelecer e monitorar os perfis de susceptibilidade/resistência da droga dos isolados do parasito, obtidos recentemente em áreas endêmicas (Cioli et al., 2004).

No Brasil, Pellegrino et al., (1977) ensaiaram o PZQ em camundongos, hamsters e macacos *Cebus* infectados experimentalmente com a cepa LE. Nos camundongos, doses orais de PZQ de 100 e 50 mg/kg, durante cinco dias, produziram alterações significativas do oograma e deslocamento acentuado dos vermes para o fígado. Nos camundongos, o índice terapêutico foi de 153 mg/kg. Nos hamsters, os vermes mostraram-se mais sensíveis à droga. De fato, doses de 12,5 mg/kg/dia, durante cinco dias produziram deslocamento dos vermes para o fígado e alterações do oograma, ambos, em torno de 60% dos animais. Já com dose de 25 mg/kg/dia, por cinco dias, todos os vermes foram deslocados para o fígado, com 88,6% deles retidos no mesmo e com 100% dos animais apresentando alterações do oograma; com doses de 12,5 e 6,5 mg/kg, também foram observadas estas alterações, embora num percentual bem menor dos animais. Em dois macacos *Cebus* tratados por via oral com dose total de 30 e 60mg/kg, dividida em três administrações, no mesmo dia, embora houvesse indicações de atividade esquistossomicida, mostrando grande redução da população de vermes, os poucos sobreviventes, estavam com sua postura de ovos preservada. Deve-se destacar, que em ambos os macacos foram encontrados ovos viáveis no intestino delgado e grosso, porém numa série de curetagens retais não foram vistos ovos de *S. mansoni*. Em um macaco *Cebus* tratado com dose única oral de 100 mg/kg e sacrificado após 138 dias, não foram encontrados nem vermes nem ovos nos intestinos delgados, grosso e no reto (Pellegrino et al., 1977). Deve-se destacar que resultados semelhantes foram encontrados quando camundongos e macacos *Cebus* foram tratados com PZQ por via intramuscular, e com um pouco menos de atividade por inalação nasal (Pellegrino et al., 1977). Baseando-se nestas informações foi sugerido que dose única oral de 20 mg/kg poderia reduzir o número de vermes de *S. mansoni*, no homem, em até 95%, o que corresponderia a uma taxa de cura de 60% (Webbe & James 1977). Todavia, desde o primeiro ensaio clínico na esquistossomose mansônica com PZQ realizado no Brasil (Katz et al., 1979), ficou claro que a dose deveria ser mais do que o dobro da sugerida pelos estudos experimentais.

Embora a Organização Mundial da Saúde preconize o emprego do PZQ em larga escala, com objetivo de reduzir a morbidade da infecção esquistossomótica, há uma grande preocupação com a resistência, o que sugere o desenvolvimento de novos fármacos (Ferrari et al., 2003).

A eficácia do medicamento depende de diversas variáveis, tais como a espécie do hospedeiro e o tempo de infecção. Por exemplo, no camundongo a droga é mais eficaz aos 28 dias de infecção do que aos 49 dias ou em infecções unissexuais por machos do que por fêmeas (Pica-Mattocchia & Cioli 2004). Esses achados têm sido consubstanciados por estudos

que demonstraram reduzido resultado terapêutico sobre as formas jovens na infecção e re-infecção (Silva et al., 2003).

Recentemente, tem sido verificada população de *S. mansoni* resistentes ao PZQ (Bonesso-Sabadini et al., 2002, Doenhoff et al., 2002). A quimioterapia de várias infecções helmínticas é dificultada pelo surgimento de resistência a certas drogas anti-helmínticas. Sob o ponto de vista conceitual, a resistência a uma droga esquistossomicida foi definida como uma perda de sensibilidade, geneticamente transmitida numa população de parasitos, que era previamente sensível à droga anteriormente administrada (Fallon et al., 1996). Experimentos em camundongos infectados com um isolado de *S. mansoni* obtido do Senegal, comparado com outros isolados mantidos em laboratório (de Porto Rico e Quênia), mostraram que o isolado de Senegal foi relativamente refratário ao efeito do PZQ. Nesse estudo, os camundongos infectados foram tratados com cinco semanas de infecção, por ser esta a idade em que os vermes adultos se tornam suscetíveis à ação do PZQ (Fallon et al., 1996).

A diversidade genética entre linhagens resistente e suscetível tem sido bastante estudada. Foi demonstrado que marcadores moleculares com seqüências definidas podem ser aplicados como uma ferramenta útil para diferenciarem isolados de *S. mansoni* resistente e suscetível à ação de drogas (Tsai et al., 2000). Pela análise genética foi demonstrado que dois isolados de *S. mansoni* resistentes às drogas hycantone e oxaminiquine apresentam mutações no mesmo gene (Pica-Mattoccia et al., 1993).

JUSTIFICATIVA

Considerando-se as facilidades de manutenção e suscetibilidade à infecção, os camundongos são mais utilizados como modelos experimentais nos estudos sobre a ação de esquistossomicidas. Entretanto, foi verificado que *N. squamipes* responde ao tratamento com esquistossomicida (praziquantel), quando infectado com um isolado de laboratório de *S. mansoni* (BH) (dados não publicados). Porém, não se sabe qual a suscetibilidade ao PZQ de esquistossomos circulantes em roedores silvestres. A compreensão do papel de *N. squamipes* na transmissão da esquistossomose mansônica tem sido objeto de estudo e apesar dos esforços empreendidos, alguns aspectos ainda precisam ser elucidados e podem ser relevantes no âmbito das iniciativas de controle. A população humana residente no local de captura e isolamento do isolado murino, desde longa data recebe tratamento com esquistossomicidas (etrenol, oxaminiquine e praziquantel). Entretanto, ainda não se conhece os efeitos do PZQ, droga

atualmente preconizada para o tratamento da esquistossomose, sobre isolados de *S. mansoni* de roedores silvestres. Portanto, tentaremos responder a essa questão, através da verificação de diferenças entre os parâmetros biológicos e morfológicos dos helmintos frente à terapêutica com PZQ no modelo camundongo, utilizando o isolado BH como controle.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta terapêutica ao praziquantel de isolado murino de *S. mansoni* obtido de *N. squamipes* através de parâmetros morfológicos e biológicos de *S. mansoni*.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar as características parasitológicas do isolado murino na infecção experimental de *Mus musculus*, comparando com o isolado BH (Belo Horizonte), através do número de vermes adultos recuperados, da dinâmica de eliminação fecal de ovos e do oograma intestinal.
2. Verificar a ocorrência de alterações morfológicas e morfométricas nos vermes adultos, através da microscopia de campo claro, microscopia laser confocal e microscopia eletrônica de varredura, após tratamento com praziquantel em diferentes dosagens.
3. Verificar se há diferenças na susceptibilidade ao praziquantel do isolado de *N. squamipes* (R) em comparação com o isolado BH (suscetível).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Comitê de Ética

Todos os experimentos utilizando animais foram realizados segundo as diretrizes internacionais válidas para a experimentação animal (Ellery, 1985) e estavam de acordo com as regras do Comitê de Ética Animal (CEUA: L-0017/08) do Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) e do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais (IBAMA, número de licença: 02001.000384/00-12).

3.2. Área de trabalho de campo e isolamento do *S. mansoni* de *N. squamipes*

O estudo foi realizado no município de Sumidouro (22° 02' 46" S, 42° 41' 21" W), uma área rural de Mata Atlântica situada no Rio de Janeiro (Figura 6). As armadilhas de captura (do tipo “live-traps”, da marca Tomahawk® (40.64cm x 12.70cm x 12.70cm) foram guarnecidas com uma touca cirúrgica que ficou acondicionada externamente no fundo da gaiola e serviu para a coleta de fezes (Figura 7). Após este procedimento os animais foram liberados nos locais onde foram capturados. Os locais de captura foram estabelecidos ao longo de cursos d'água e áreas inundadas, de acordo com os hábitos semi-aquáticos de *N. squamipes* (D'Andrea et al., 2007). Amostras de fezes foram coletadas de cada roedor capturado. Para confirmar a infecção, amostras de fezes foram preparadas em lâminas e examinadas ao microscópio, utilizando a técnica de esfregaço grosso de fezes de Kato-Katz (Katz et al., 1972). Os miracídios obtidos de ovos das amostras fecais positivas para *S. mansoni* de três *N. squamipes* (isolado R), foram utilizados para a eclosão miracidiana (Paraense & Corrêa 1978), necessária para a infecção de *B. glabrata* criadas em laboratório. A infecção experimental de *B. glabrata* foi realizada no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios (LBPMSR), Instituto Oswaldo Cruz (IOC).

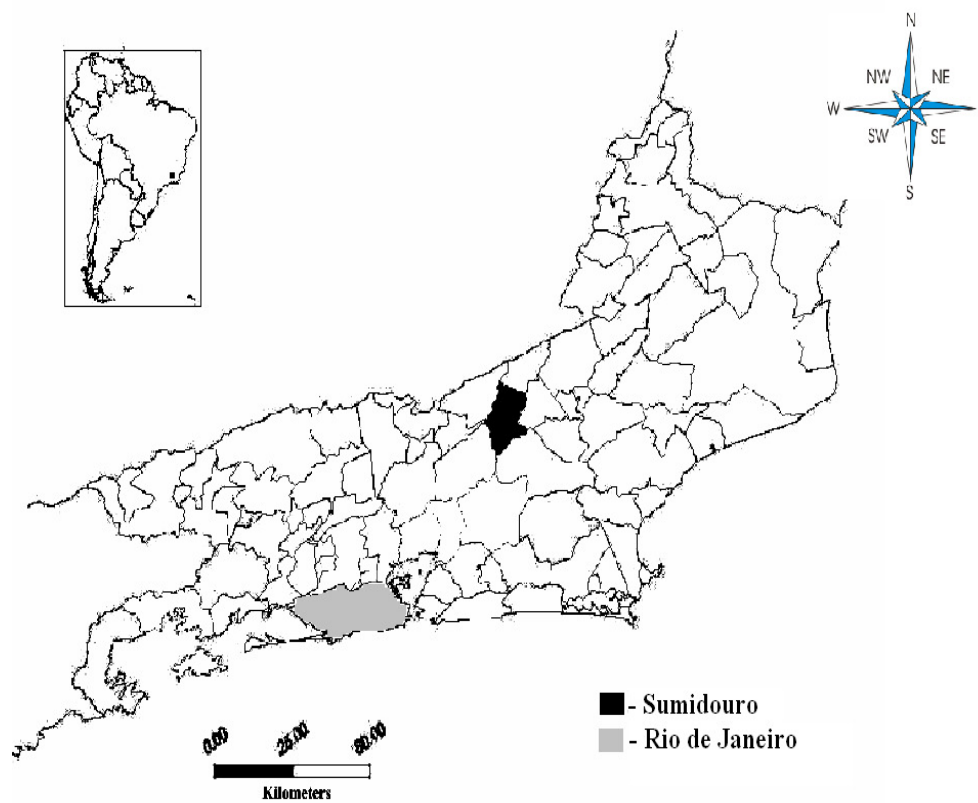


Figura 6: Localização do Município de Sumidouro no mapa do estado do Rio de Janeiro.
Fonte: IBGE 2006.



Figura 7: *Nectomys squamipes* capturado em armadilha guarnecida de touca cirúrgica para recolhimento de fezes do roedor. Fonte: Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios– IOC.

Mus musculus Swiss Webster de ambos os sexos foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz. Os camundongos foram acondicionados em condições padrão: caixas de polipropileno (40 × 33 cm) com tampas de aço inoxidável em local com temperatura (25 ± 1 °C) e umidade ($60 \pm 10\%$) controladas e ciclo artificial claro/ escuro (12:12 hs). Os animais tiveram livre acesso à água e ração (Nuvilab CR-1, Paraná, Brasil).

Além do isolado obtido de *N. squamipes*, que mantivemos no Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres e Reservatórios, utilizamos como controle o isolado BH (Belo Horizonte) que é mantido rotineiramente no Laboratório Nacional de Referência em Malacologia Médica, Instituto Oswaldo Cruz.

3.4. Infecção experimental

Os procedimentos para as infecções experimentais foram descritos anteriormente (Freire et al., 2003). Camundongos machos e fêmeas (n = 28) foram infectados por via subcutânea com 50 cercárias (isolado R), enquanto os camundongos do grupo controle (n = 25) foram também expostos a 50 cercárias do isolado BH (Delgado et al., 1992; Drescher et al., 1993).

3.5. Esquema terapêutico e grupos experimentais

Os camundongos (n=5, grupo) receberam praziquantel (Merck ®) dissolvido em 2% Cremophor-EL (Sigma, Chemical Company, St. Louis, EUA) por gavagem gástrica em doses total de 62,5mg/kg, 125mg/kg, 250mg/kg e 500mg/kg) cada dose, dividida por três dias (49, 50 e 51 dias após a infecção) (Sabah et al., 1986). Camundongos infectados não tratados fizeram parte do grupo controle da infecção.

Grupos experimentais

Grupo controle (n= 5): Não tratados com praziquantel (PZQ).

Grupo tratado 1 (n= 5): Tratados com 62,5 mg/kg de PZQ.

Grupo tratado 2 (n= 6): Tratados com 125 mg/kg de PZQ.

Grupo tratado 3 (n= 6): Tratados com 250 mg/kg de PZQ.

Grupo tratado 4 (n= 6): Tratados com 500 mg/kg de PZQ.

Isolado BH (isolado controle)

Grupo controle (n= 5): Não tratados com praziquantel (PZQ).

Grupo tratado 1 (n= 5): Tratados com 62,5 mg/kg de PZQ .

Grupo tratado 2 (n= 5): Tratados com 125 mg/kg de PZQ.

Grupo tratado 3 (n= 5): Tratados com 250 mg/kg de PZQ.

Grupo tratado 4 (n= 5): Tratados com 500 mg/kg de PZQ.

3.6. Recuperação de vermes

Duas semanas após o tratamento, os camundongos de ambos os isolados foram eutanasiados usando uma câmara de CO₂. Vermes adultos recuperados por perfusão hepática e mesentérica foram lavados em solução salina, fixados em AFA (álcool, formalina e ácido acético glacial) em temperatura ambiente, contados e sexados com o auxílio de um microscópio estereoscópico (Smithers & Terry, 1965). A carga parasitária (infectividade) foi determinada através da porcentagem de maturação de cercárias em vermes adultos recuperados do sistema porta e veias mesentéricas (Freire et al., 2003). A redução percentual da carga de vermes em cada grupo tratado com PZQ (Cioli et al., 2004) foi calculado de acordo com a seguinte equação:

$$\text{Redução (\%)} = \frac{(\text{Número de vermes do grupo controle} - \text{número de vermes do grupo tratado}) \times 100}{(\text{Número de vermes do grupo controle})}$$

3.7. Análise por microscopia de campo claro: estudo morfológico e morfométrico

Os vermes adultos foram corados com carmim clorídrico 2,5%, desidratados em série alcoólica (70%, 90% e 100%, clarificados em salicilato de metila com bálsamo do Canadá (1:2) e montados em lâminas histológicas. Todos os helmintos montados foram analisados por microscopia de campo claro em microscópio Olympus BX50 (Neves et al., 1998).

As lâminas histológicas foram analisadas por meio de um analisador digital de imagens equipado com o software (Image Pro Plus, Media Cybernetics, USA). Nos adultos machos foram estudados os seguintes caracteres: o número, área, perímetro e diâmetro dos lobos testiculares. Nas fêmeas: ausência ou presença e dimensões do ovo e tamanho do ovário. Em ambos os sexos analisamos: a área da ventosa oral, área da ventosa ventral e a distância entre elas. A espessura do tegumento foi analisada em ambos os sexos, nos machos

analisamos a distribuição dos tubérculos e a sua altura e espessura (Machado-Silva et al., 1995, Neves et al., 1998) (Figura 8).

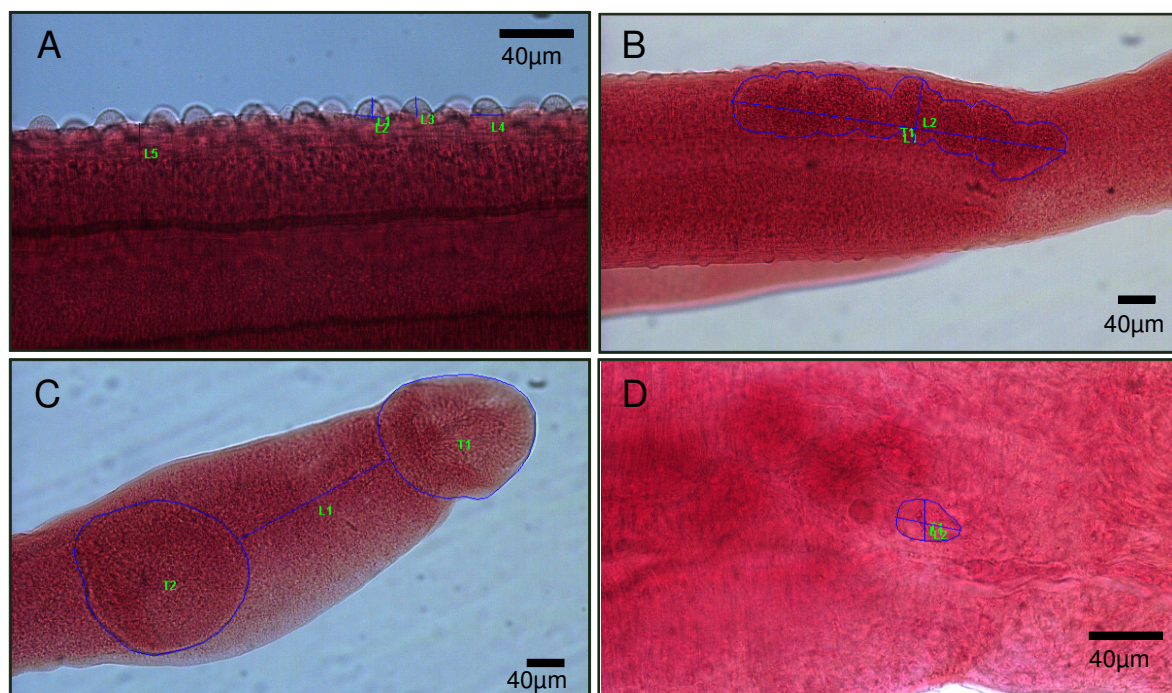


Figura 8: Parâmetros morfométricos utilizados no estudo dos vermes adultos machos de *Schistosoma mansoni* corados por Carmim clorídrico. A- Tubérculos; B- Aparelho reprodutor: lobos testiculares; C- Ventosa oral e ventral e distância entre elas; D- Vesícula seminal.

3.8. Análise por microscopia de varredura laser confocal

Espécimes de *S. mansoni* de ambos os sexos foram estudados no microscópio LSM 510 - ZETA, Zeiss (Neves et al., 2004). Foram analisados parâmetros do sistema reprodutor masculino (lobos testiculares, testículos supranumerários e vesícula seminal) e feminino (ovário, dos oócitos, receptáculo seminal, glândulas vitelínicas, oótipo e útero) (Neves et al., 2005).

3.9. Análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Alguns espécimes de *S. mansoni* foram preservados em álcool a 70% ou AFA para estudo em MEV, a fim de evidenciar alterações no tegumento (Machado-Silva et al., 1998). O processamento foi realizado de acordo com De Souza (2007). O processamento obedeceu às seguintes etapas: fixação dos espécimes em AFA, álcool 70%, 50%, 30%, 10%, tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 (3x), pós-fixação em tetróxido de ósmio (OsO₄) à 1% e

ferrocianeto de potássio ($K_4Fe(CN)_6$) à 0,8%, lavagem em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH7,2 (3x) e desidratados em gradiente de etanol (50°-100° GL), a secagem do material foi realizada pelo ponto crítico usando CO_2 líquido, os helmintos secos foram montados em suportes metálicos revestidos de fita dupla face e metalizados, recobertos por uma camada de ouro e examinados através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) no microscópio eletrônico Jeol JSM 5310.

3.10. Avaliação parasitológica

As fezes dos camundongos foram individualmente coletadas, a cada semana, a partir da sexta semana até a eutanásia (nona semana). O estabelecimento da infecção e a dinâmica de eliminação de ovos nas fezes foram determinadas pela técnica de Kato-Katz (Katz et al., 1972), utilizando o Kit Helm-Tec® para verificar o número de ovos por grama de fezes (OPG) que cada animal eliminava, por microscopia ótica.

3.11. Oograma intestinal (Estágios de desenvolvimento dos ovos)

O intestino delgado foi retirado de cada animal, aberto longitudinalmente e separado em duas partes iguais (proximal e distal). Uma amostra (um centímetro de comprimento) do início da última porção foi retirada e esmagada entre duas lâminas de vidro para obter uma preparação fina (Machado-Silva et al., 1991). A percentagem de ovos da mucosa intestinal em vários estágios de desenvolvimento (imaturo, maduro e morto) foi determinada por microscopia de luz, segundo o critério proposto por Pellegrino et al., (1962).

3.12. Análise estatística dos dados

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa estatístico Graph Pad Instat. Dados biológicos foram analisados através dos testes T de student e/ou Análise de variância (ANOVA). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativamente diferentes.

4. RESULTADOS

4.1. DADOS PARASITOLÓGICOS

4.1.1. Redução da carga de parasitária

Camundongos do grupo controle (infectados e não tratados) do isolado R apresentaram um número médio maior de vermes recuperados (31 ± 4 ; 62%) quando comparado ao isolado BH (25 ± 3 , 50%).

Os dados sobre a redução da carga parasitária revelaram que a eficácia do tratamento foi dose-dependente (Figura 9). Em doses baixas (62,5mg/kg), a redução da carga de vermes foi igualmente baixa para o isolado R (25 ± 4 ; 19%) e para o isolado BH (17 ± 5 ; 32%). Quando foi administrada a dosagem de 125mg/kg de PZQ, a eficácia do isolado R aumentou (23 ± 5 , 26%), em relação ao isolado BH (11 ± 2 ; 56%). A eficácia do tratamento foi significativamente maior ($p < 0,05$) nas duas concentrações maiores testadas de praziquantel: 250mg/kg (9 ± 3 ; 71% e de 6 ± 2 ; 76%) e 500mg/kg (4 ± 1 , 87% e 1 ± 1 ; 96%), para o isolado R e BH, respectivamente. Nota-se que o tratamento causou uma redução dose-dependente na razão sexual (macho/fêmea) apenas no isolado R. A relação macho/fêmea diminuiu de 4:1 (grupo não tratado) para 1:1 (grupo 4) (Tabela 1).

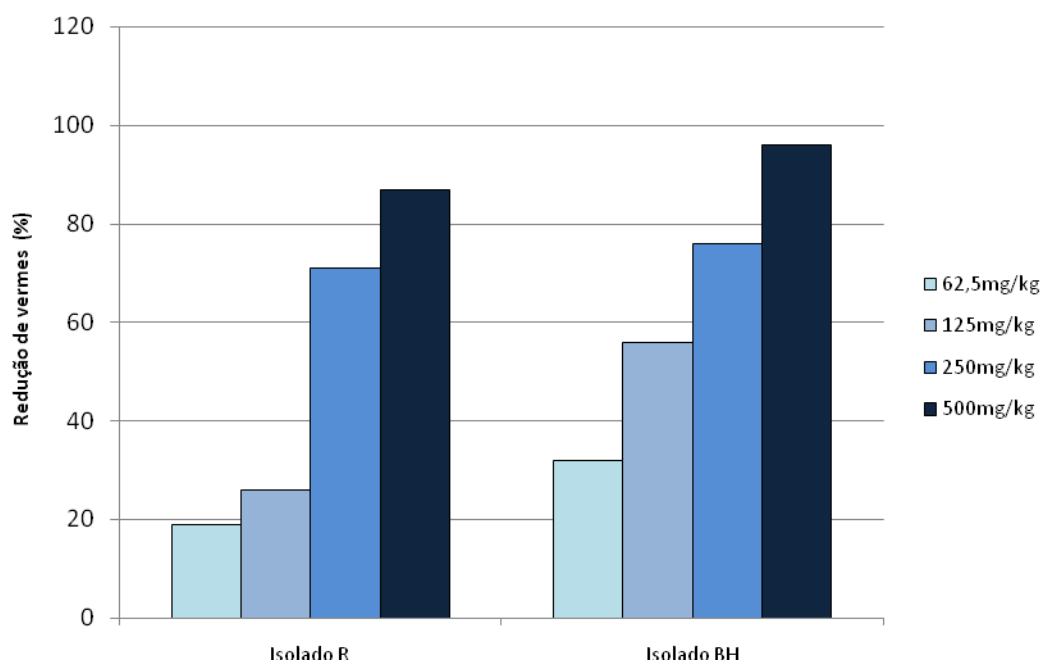


Figura 9: Redução da carga parasitária, de *Schistosoma mansoni* dos isolados R e BH de acordo com a dose administrada de praziquantel.

4.1.2. Eliminação de ovos nas fezes

A cinética de eliminação dos ovos nas fezes indicou que ambos os isolados apresentaram comportamento semelhante (figura 10: A e B). Os ovos foram inicialmente detectados nas fezes, na sexta semana de infecção, com um pico de eliminação na sétima semana, declinando posteriormente, o declínio foi coincidente com a administração da droga. Houve uma diminuição dose-dependente na contagem de ovos nas fezes. O praziquantel foi significativamente ($p=0,003$) eficaz contra o isolado R na dose de 500mg/kg, aonde a eliminação de ovos chegou à zero no final do estudo. Com relação ao isolado BH, ao final do experimento todos os animais dos grupos tratados pararam de eliminar ovos nas fezes. A eliminação de ovos dos grupos controle de ambos isolados (BH ou R) foi significativamente maior ($p<0,001$) do que a eliminação dos grupos tratados com PZQ.

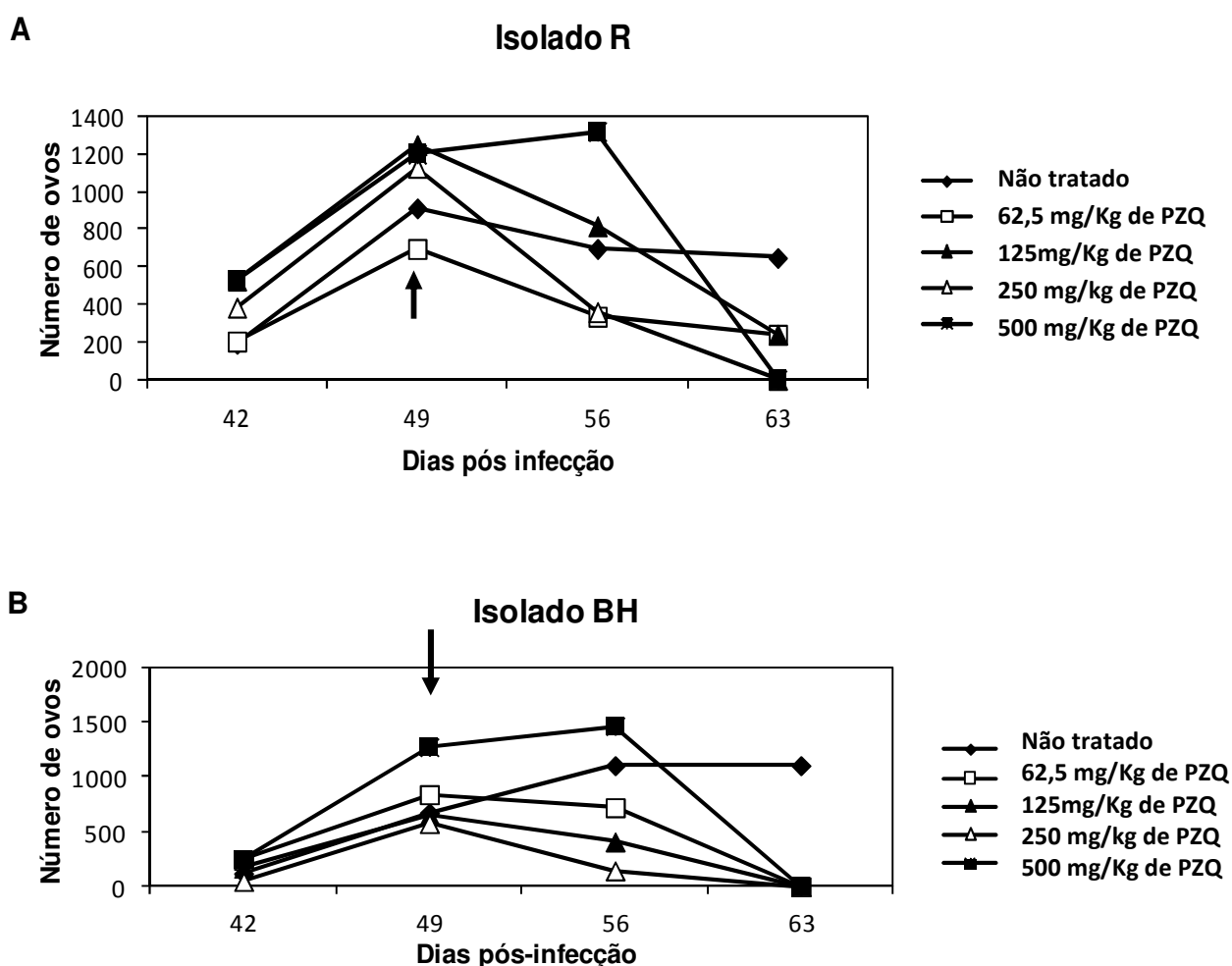


Figura 10: Dinâmica de eliminação de ovos de *Schistosoma mansoni* nas fezes (Método Kato-Katz) de camundongos albinos tratados com praziquantel (PZQ). A: Isolado R e B: Isolado BH. A Seta indica a o dia do tratamento.

4.1.3. Oograma

Os camundongos dos grupos tratados e dos não tratados apresentaram ovos em todas as fases de desenvolvimento, embora a eficácia terapêutica tenha sido dependente do esquema de tratamento. Com a menor dose (62,5mg/kg) de PZQ, o percentual de ovos imaturos foi de 17% (isolado R) e 38% (isolado BH). Na próxima dose mais alta (125mg/kg), o isolado R revelou um ligeiro aumento na porcentagem de ovos imaturos (20%), enquanto a taxa para o isolado BH caiu de 38% para 16%. Quando foi administrado 250mg/kg, ovos imaturos diminuíram significativamente a 1% (isolado R) e 4% (isolado BH). Na maior dose testada (500mg/kg), não foram encontrados ovos imaturos no isolado R, ao passo que em BH, a taxa foi de 8%.

Houve um expressivo aumento na porcentagem de ovos mortos em todos os grupos tratados, com diferença significativa ($p < 0,0001$) com um aumento de 62% e 64% nos grupos 3 e 4, respectivamente (isolado R). A porcentagem de ovos mortos subiu de 34% (grupo 1) para 58% (grupo 3) no isolado BH. Embora o grupo 4 tenha apresentado um aumento menor na porcentagem de ovos mortos, para 46%, foi significativamente maior ($p < 0,05$) em comparação com os 8% no grupo controle.

Não houve correlação entre o número de vermes recuperados e o padrão de oograma ou eliminação de ovos nas fezes.

4.2. ESTUDO MORFOLOGICO

4.2.1 MICROSCOPIA DE CAMPO CLARO

4.2.1.1. Vermes adultos machos do isolado R

Foram analisados 51 helmintos machos no grupo não tratado. Com relação ao aparelho reprodutor, o número de lobos testiculares variou de 6 a 12, contudo 60% dos exemplares analisados apresentaram 8 (41%) ou 9 (19%) lobos. Não foi verificada a presença de lobos supranumerários neste grupo. Dentre as vesículas seminais examinadas 98% apresentaram espermatozoides dos quais, 17% apresentaram pouco material, 37% quantidade média e 44% muito material na vesícula seminal. Todos os vermes analisados apresentavam o corpo coberto de tubérculos, 35% dos espécimes apresentaram uma intensidade média destas estruturas, ao passo que 65% apresentaram uma grande intensidade de tubérculos distribuídos ao longo do tegumento (Tabela 1).

Nos animais tratados com 250mg/kg de PZQ (n= 22), o número de lobos testiculares variou de seis a nove. A maioria dos vermes (59%) apresentou oito (41%) ou nove (18%) lobos testiculares. A vesícula seminal apresentou espermatozóides em 95% dos espécimes e teve uma intensidade média de espermatozóides em 53% destas estruturas. Mais da metade dos espécimes analisados (59%) apresentaram diminuição da quantidade de tubérculos ao longo do tegumento (Tabela 1 e Figura 11).

Nos animais tratados com 500mg/kg de PZQ (n=11), o número de lobos testiculares variou entre sete e onze e 55% dos espécimes apresentaram nove ou mais lobos testiculares. Todas as vesículas seminais apresentaram espermatozóides em seu interior, a maioria (73%) com grande quantidade de espermatozóides. Embora, todos os helmintos analisados tenham apresentado certa quantidade de tubérculos distribuídos ao longo do tegumento, verificamos uma diminuição destas estruturas em 82% dos vermes (Tabela 1 e Figura 11)

Tabela 1: Análise de parâmetros morfológicos de vermes adultos machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni* do isolado R e BH, recuperados de camundongos albinos tratados com praziquantel.

PARÂMETROS:	Grupo não tratado R	Grupo tratado 250 R	Grupo tratado 500 R	Grupo não tratado BH	Grupo tratado 250 BH	Grupo tratado 500 BH
Lobos testiculares supranumerários	0%	0%	2%	2%	6%	12%
Vesícula seminal						
Espermatozoides	98%	95%	100%	97%	100%	100%
Intensidade (+++)	44%	5%	73%	25%	25%	62%
Tubérculos	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Intensidade (+++)	65%	41%	18%	100%	42%	50%
Glândulas vitelínicas						
Intensidade (+++)	94%	89%	17%	80%	37%	67%
Vitelo (+++)	82%	45%	17%	23%	25%	33%
Ovário						
Diferenciação celular	100%	89%	100%	100%	100%	100%
Eliminação de oócitos	76%	78%	75%	98%	81%	83%
Número de oócitos eliminados (2 ou mais)	59%	43%	75%	94%	77%	100%
Espermateca						
Presença de espermatozoides	100%	100%	67%	100%	100%	100%
Intensidade de espermatozoides (+++)	100%	83%	100%	100%	86%	100%
Ovo						
Presença	100%	56%	67%	97%	81%	67%
Localização (oótipo)	88%	100%	100%	97%	100%	100%
(útero)	12%	0%	0%	3%	0%	0%

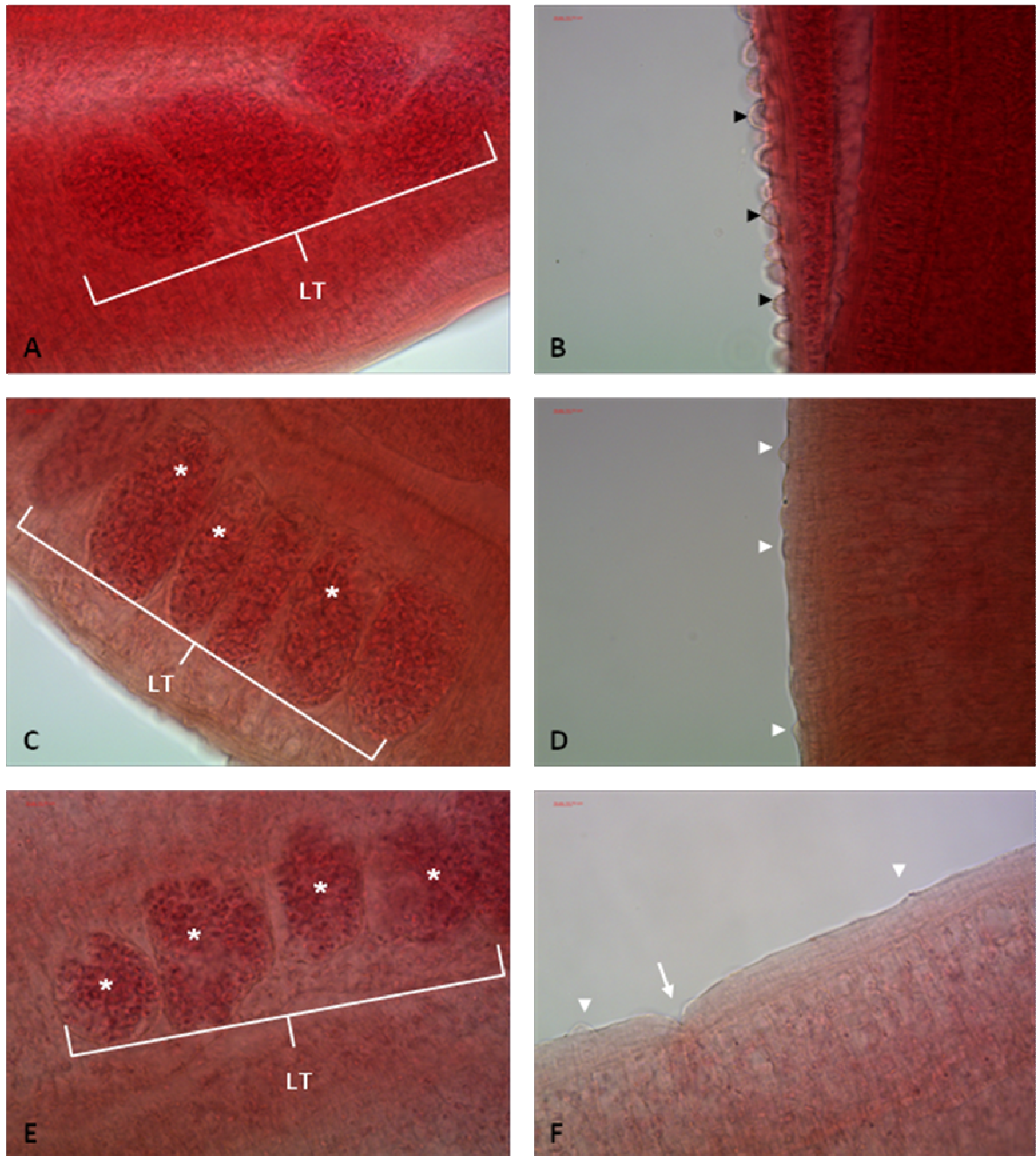


Figura 11: Fotomicrografias do sistema reprodutor e superfície tegumentar de vermes adultos machos de *Schistosoma mansoni* do isolado R tratados com praziquantel, por microscopia de campo claro: Figura A [lobos testiculares (LT) apresentando densidade normal de células]. Figura B (densidade de tubérculos) do grupo não tratado (controle). Figuras C (asteriscos, demarcam a diminuição do conteúdo celular dos LT) e D, cabeça de seta, demonstram a diminuição dos tubérculos (tratado 250mg) e Figuras E (asteriscos, demarcam a diminuição do conteúdo celular dos LT) e F (tratado 500mg) cabeça de seta, demonstram a diminuição dos tubérculos e seta mostra reentrância no tegumento.

4.2.1.2. Vermes adultos fêmeas do isolado R

O ovário de todos os vermes (n=17) do grupo não tratado apresentou diferenciação celular e 76% dos espécimes eliminavam oócitos, com dois ou mais oócitos em (59%) dos espécimes. Quanto à densidade de glândulas vitelínicas, 94% apresentavam grande densidade destas estruturas e 82% apresentaram grande quantidade de vitelo. Todas as espermatecas analisadas apresentaram grande quantidade de espermatozóides. O ovo esteve presente em todos os helmintos e na maioria das vezes estava localizado no oótipo (88%) (Tabela 1).

No grupo tratado com 250mg/kg de PZQ (n=9), o ovário de 11% das fêmeas deste grupo não estava com as células diferenciadas. Em relação à eliminação de oócitos este grupo não teve variação quando comparado ao grupo controle, porém houve uma diminuição de 16% na eliminação de dois ou mais oócitos. Embora a densidade de glândulas vitelínicas tenha diminuído somente 5%, a quantidade de vitelo diminuiu em relação ao grupo controle, visto que somente 45% dos vermes analisados apresentaram grande quantidade de vitelo. A análise da espermateca revelou uma diminuição na quantidade de espermatozóides em 17% dos vermes deste grupo em relação ao não tratado. Apenas 56% apresentaram ovo, os quais se localizavam no oótipo (100%) (Tabela 1).

O grupo tratado com 500mg/kg de PZQ (n=6) apresentou ovário com diferenciação celular em todos os espécimes analisados. Porém, somente 25% destes estavam eliminando oócitos. Quanto ao número de oócitos eliminados, 75% eliminavam dois ou mais oócitos. Neste grupo 67% apresentaram espermatozóides na espermateca. Com relação à presença de ovo, somente 67% dos espécimes apresentaram ovo e todos estavam localizados no oótipo (Tabela 1).

4.2.1.3. Vermes adultos machos do isolado BH

Os helmintos analisados do grupo não tratado (n=42) apresentaram de oito a treze lobos testiculares, sendo que 50% destes tinham entre onze e treze lobos. O lobo supranumerário esteve presente em 2% dos vermes. A vesícula seminal apresentou material em 97% dos helmintos. Somente 25% das vesículas examinadas apresentaram grande quantidade de espermatozóides. O tegumento apresentou grande intensidade de tubérculos em todos os espécimes analisados neste grupo (Tabela 1 e Figura 12).

O grupo tratado com 250mg/kg de PZQ (n=36) apresentou uma grande variação no número de tubérculos (5-11) e 6% dos helmintos apresentaram lobo testicular supranumerário. Porém, 74% apresentaram mais de oito tubérculos. A vesícula seminal tinha

a presença de espermatozóides em todos os helmintos e 50% delas apresentavam uma quantidade média destes. Com relação ao tegumento, 58% dos vermes apresentaram uma diminuição no número de tubérculos (Tabela 1 e Figura 12).

Os helmintos do grupo tratado com 500mg/kg de PZQ (n=8), tiveram o número de lobos testiculares variando de nove a treze e 12% dos vermes apresentaram lobo supranumerário. A vesícula seminal apresentou material em todos os espécimes analisados, porém 38% destas estruturas tinham pouco material no seu interior. Quanto ao tegumento, 50% dos helmintos apresentaram número menor de tubérculos em relação ao grupo não tratado (Tabela 1 e Figura 12).

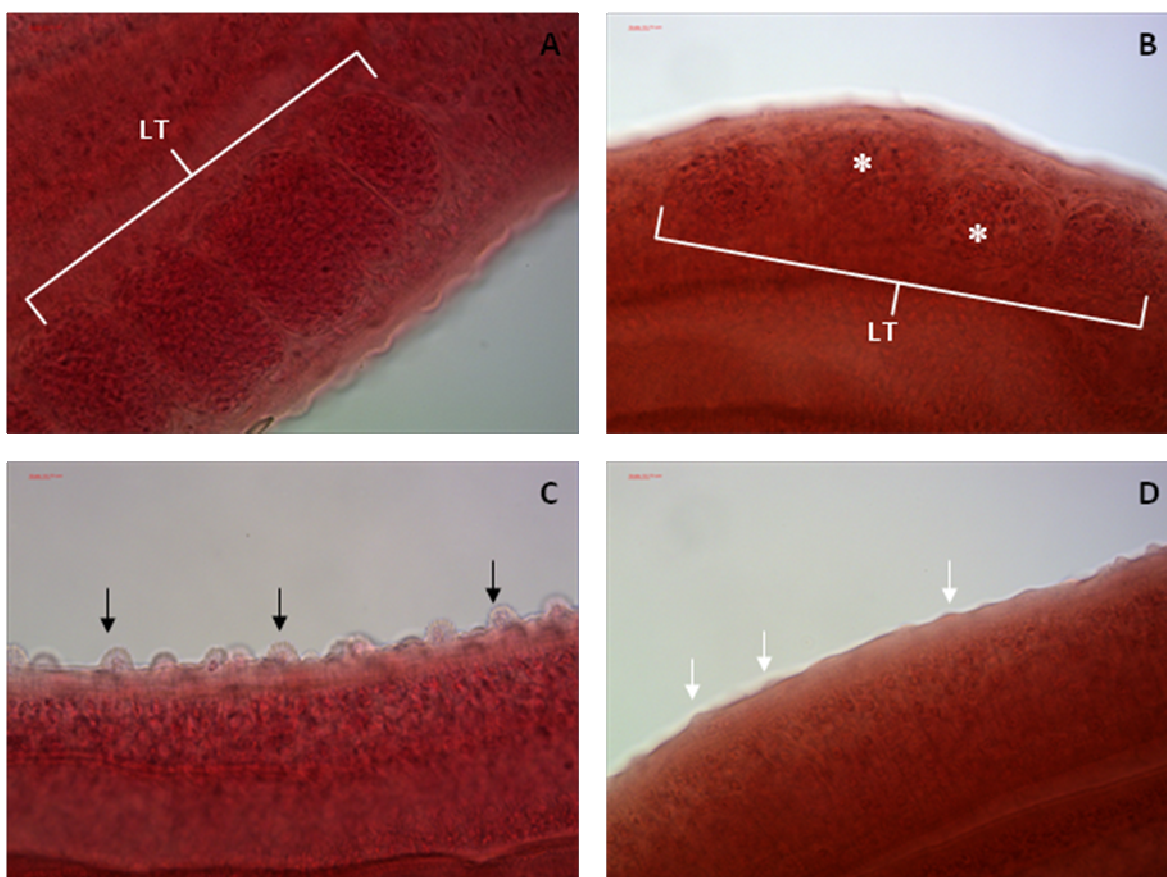


Figura 12: Fotomicrografias do sistema reprodutor e do tegumento de vermes adultos machos de *Schistosoma mansoni* do isolado BH tratados com 250mg/Kg de PZQ, análise por microscopia de campo claro. Figura A, lobos testiculares (LT) do grupo não tratado, repleto de células. Figura B, lobos testiculares do grupo tratado com redução do conteúdo celular (asteriscos). Figura C, tegumento do grupo não tratado, apresentando aspecto normal com tubérculos distribuídos pela superfície (setas escuras). Figura D, tegumento do grupo tratado, apresentando diminuição na densidade e no tamanho dos tubérculos (setas claras).

4.2.1.4. Vermes adultos fêmeas do isolado BH

O ovário dos espécimes do grupo não tratado (n=35) apresentou diferenciação celular e 98% dos vermes eliminavam oócitos, sendo que 94% eliminavam dois ou mais oócitos. A espermateca de todos os exemplares analisados neste grupo apresentou grande quantidade de espermatozóides. As glândulas vitelínicas apresentaram grande densidade em 80%. Em 26%, a quantidade de vitelo era pouca, muita (23%) ou média (51%). Dos espécimes analisados neste grupo, 97% apresentaram ovo. Quanto à localização, 3% apresentaram ovo uterino e o restante teve como localização no oótipo (Tabela 1).

O grupo tratado com 250mg/kg de PZQ (n=16), apresentou ovário com diferenciação celular. A porcentagem de espécimes que não eliminavam oócitos (19%) aumentou em relação ao grupo não tratado (2%), o mesmo ocorreu com a quantidade de oócitos eliminados, os vermes que eliminaram até dois oócitos por vez, aumentaram 17% em relação ao grupo não tratado. Todas as espermatecas analisadas apresentaram material em seu interior, destas 86% apresentavam grande quantidade de espermatozóides. Apenas 37% dos helmintos analisados apresentaram grande quantidade de glândulas vitelínicas. A presença de ovo neste grupo teve uma diminuição em 16% em relação ao não tratado. A localização do ovo foi no oótipo em todos os vermes (Tabela 1).

No grupo tratado com 500mg/kg de PZQ (n=6), os ovários apresentavam células em diferentes estágios de maturação com evidente diferenciação celular e 83% destes, eliminavam oócitos. Todas as espermatecas analisadas apresentaram grande quantidade de material em seu interior. A quantidade de glândulas vitelínicas reduziu 13% em relação ao grupo não tratado. Houve uma redução de 30% na presença do ovo neste grupo em relação ao não tratado (Tabela 1).

4.2.2. DADOS MORFOMÉTRICOS

4.2.2.1. Vermes adultos machos do isolado R

As estruturas analisadas apresentaram diferenças significativas entre os grupos, com exceção da largura dos lobos testiculares ($p=0,134$). A área da ventosa oral teve média menor no grupo tratado com 250mg/kg de PZQ quando comparada ao grupo não tratado, com diferença significativa ($p<0,001$). Quando foram comparados os dois grupos tratados (250mg/kg de PZQ e 500mg/kg de PZQ), encontramos diferenças estatísticas significativas ($p<0,001$). A área da ventosa ventral apresentou diferença estatística quando comparada aos outros grupos analisados, porém a menor média foi observada no grupo tratado com 250mg/kg de PZQ. Quanto à distância entre as ventosas, somente encontramos diferenças estatísticas ($p<0,01$) quando comparamos o grupo não tratado com o tratado com 250mg/kg de PZQ. Com relação ao aparelho reprodutor, a área ($p<0,001$), o comprimento ($p<0,05$) e a largura ($p<0,01$) da vesícula seminal apresentaram diferenças significativas, quando comparamos o grupo não tratado com o grupo tratado com 250mg/kg de PZQ. Quanto à área e comprimento dos lobos testiculares, as medidas dos grupos tratados se apresentaram menor do que as do grupo não tratado. O tegumento dos espécimes dos grupos tratados apresentou médias de espessura de tegumento e altura de tubérculos, inferiores em relação ao grupo não tratado. Porém, somente o grupo tratado com 250mg/kg de PZQ apresentou diferença significativa nestes parâmetros quando comparado ao grupo não tratado.

4.2.2.2. Vermes adultos fêmeas do isolado R

As medidas das ventosas não apresentaram diferenças significativas entre os grupos. Com relação ao aparelho reprodutor, o comprimento do ovário apresentou diferenças estatísticas entre todas as comparações realizadas.

4.2.2.3. Vermes adultos machos do isolado BH

As ventosas não diferiram significativamente entre os grupos analisados. Quanto ao aparelho reprodutor, somente a largura da vesícula seminal foi um parâmetro que apresentou diferença significativa entre os grupos tratados ($p<0,05$) em questão. Em relação ao tegumento a altura dos tubérculos, apresentou diferença significativa ($p<0,001$), quando comparamos os grupos tratados e não tratados.

4.2.2.4. Análise morfométrica comparativa entre machos dos isolados R e BH

No grupo controle, as ventosas (oral e ventral) do isolado R apresentaram valores médios superiores em relação ao isolado BH, assim como as médias dessas estruturas se apresentaram significativamente diferentes entre os isolados. O aparelho reprodutor apresentou área e comprimento da vesícula seminal com diferenças significativas entre os isolados. Em relação aos lobos testiculares, o comprimento ($p < 0,007$) e o perímetro ($p < 0,04$) foram características significativamente diferentes entre os isolados. Em relação à espessura do tegumento os isolados não apresentaram diferenças significativas. Porém, a altura dos tubérculos apresentou média estatisticamente diferente.

Os valores médios das ventosas diferiram significativamente entre os isolados no grupo tratado com 250mg/kg de PZQ, assim como ocorreu no grupo controle. Porém, os valores médios do isolado R se apresentaram inferiores ao contrário do que aconteceu no grupo controle. A área, o comprimento e o perímetro dos lobos testiculares também foram diferentes entre os isolados, porém a vesícula seminal não apresentou diferença entre os grupos nos parâmetros analisados. Com relação ao tegumento não observamos diferenças entre os isolados analisados.

Os parâmetros analisados não diferiram entre os isolados do grupo tratado com a maior dosagem de praziquantel (500mg/kg), com exceção da área da ventosa ventral que apresentou diferença entre os isolados ($p = 0,04$), os valores médios se apresentaram superiores no isolado R.

4.2.2.5. Vermes adultos fêmeas do isolado BH

Nenhuma diferença significativa foi encontrada em relação às medidas das ventosas entre os grupos analisados. Quando analisamos o aparelho reprodutor, a área do ovário, o comprimento do ovário e o comprimento do oótipo apresentaram diferenças significativas em todas as comparações realizadas entre os grupos. O comprimento do ovo apresentou valores médios menores nos grupos tratados e apresentou diferença significativa quando comparamos o grupo tratado com 500mg/kg de PZQ e o grupo não tratado ($p < 0,05$) e também quando comparamos os grupos tratados ($p < 0,05$). A espessura do tegumento diminuiu nos grupos tratados e observamos diferença significativa quando comparamos o grupo não tratado com o grupo tratado com 250mg/kg de PZQ.

4.2.2.6. Análise morfométrica comparativa entre as fêmeas dos isolados R e BH

No grupo controle, todas as medidas das ventosas apresentaram diferenças extremamente significativas ($p < 0,0001$) entre os isolados analisados, porém os valores médios do isolado R se apresentaram inferiores em relação ao isolado BH. Em relação ao aparelho reprodutor, a área e o comprimento do ovário apresentaram diferenças extremamente significativas ($p < 0,0001$) entre os isolados e os valores do isolado R, se apresentaram inferiores aos do BH. A área ($p < 0,03$) e o comprimento ($p < 0,001$) do oótipo também apresentaram diferença significativa. O comprimento do ovo também foi um parâmetro significativamente diferente entre os isolados estudados. Contudo, a espessura do tegumento dos vermes não diferiu entre os isolados.

O grupo de vermes adultos fêmeas tratados com 250mg/kg de PZQ também apresentaram diferença significativa com relação às medidas das ventosas, além disso, as medidas destas estruturas no isolado R foram inferiores em relação às medidas do isolado BH. Os valores das medidas da espessura do tegumento foram semelhantes entre os isolados.

No grupo com maior dosagem de praziquantel (500mg/kg) as ventosas não apresentaram diferenças significativas entre os isolados, assim como as medidas do aparelho reprodutor também não diferiram. Contudo a espessura do tegumento foi significativamente diferente entre os isolados ($p < 0,01$), onde o isolado BH apresentou medidas inferiores de espessura tegumentar.

4.3. MICROSCOPIA DE VARREDURA LASER CONFOCAL

4.3.1. Vermes adultos machos do isolado R

Os helmintos do grupo não tratado apresentaram sistema reprodutor composto por grupamentos testiculares, com lobos repletos de conteúdo celular (Figura 13A). O tegumento dos helmintos deste grupo apresentou densidade normal de tubérculos (Figura 14A).

Com relação às alterações apresentadas no sistema reprodutor dos vermes dos grupos tratados, destacamos a diminuição do conteúdo celular de alguns lobos testiculares (Figura 13: B,C e E). O tegumento de vermes dos grupos tratados com PZQ apresentaram algumas alterações como: a diminuição do tamanho dos tubérculos (Figura 14C),

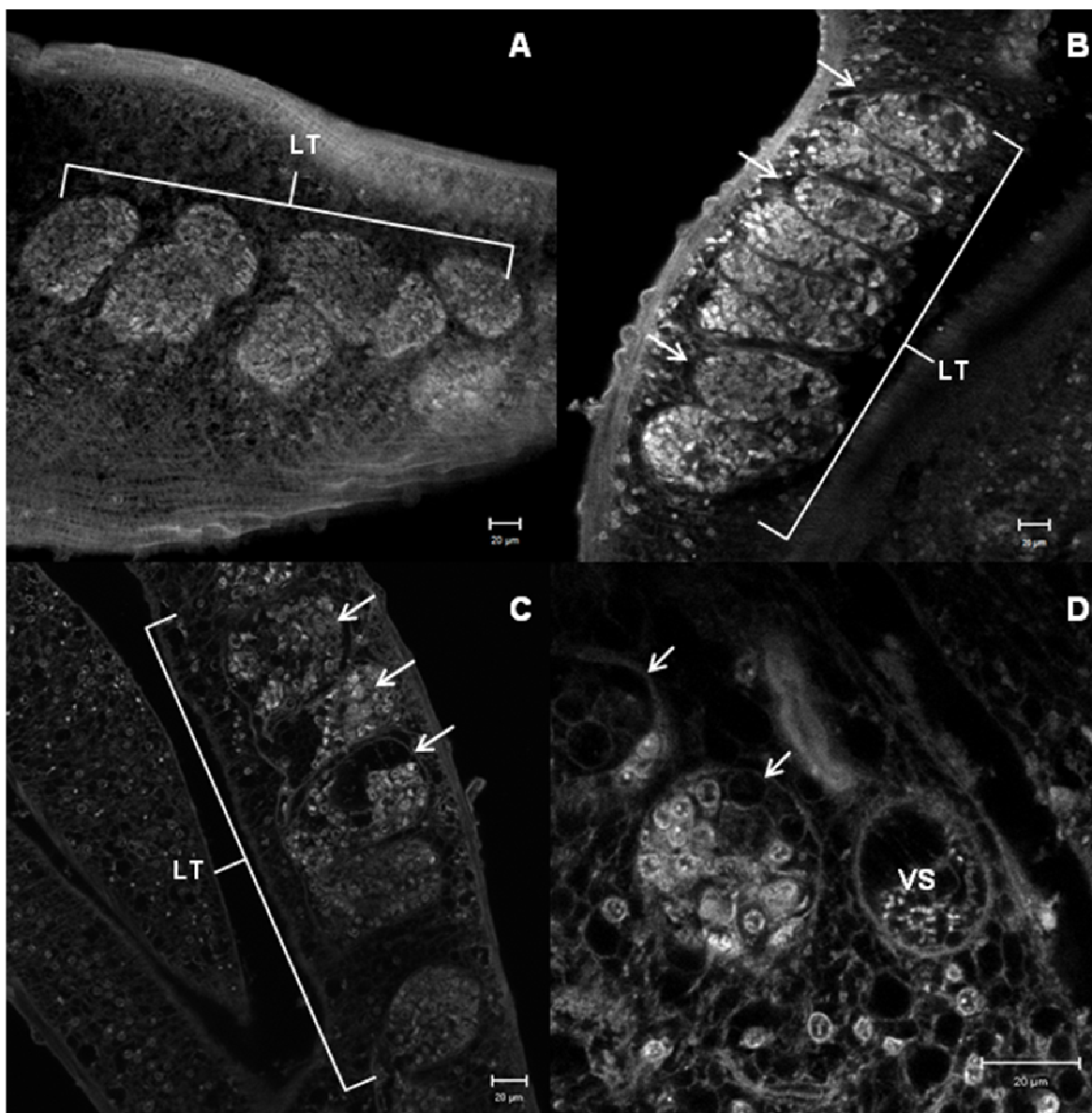


Figura 13: Fotomicrografias por microscopia de varredura laser confocal do sistema reprodutor de vermes adultos machos do isolado R de *Schistosoma mansoni*. Figura A (não tratado), apresentando densidade característica de células em todos os lobos testiculares (LB). Figura B (tratado 250mg/Kg de PZQ). Figuras C e D (tratado 500mg/kg de PZQ). As setas indicam a diminuição do conteúdo do lobo testicular. VS (vesícula seminal).

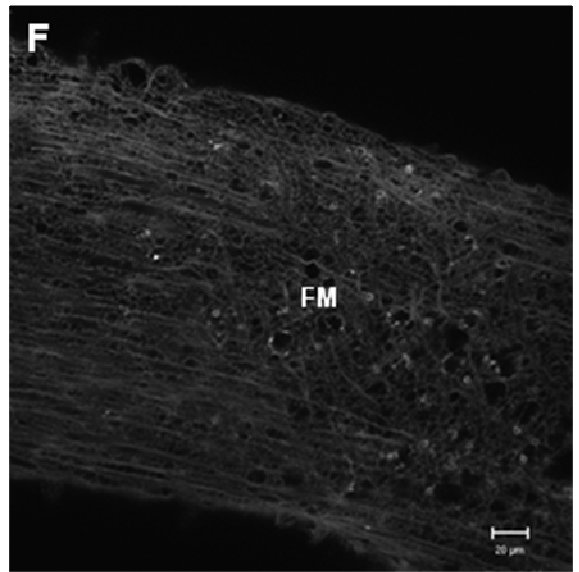
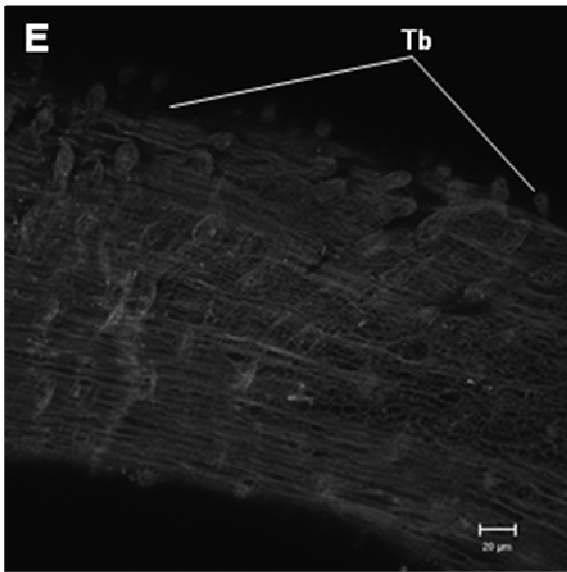
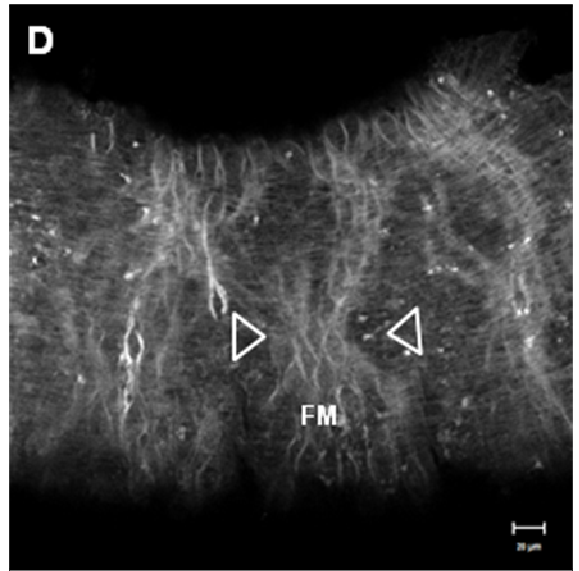
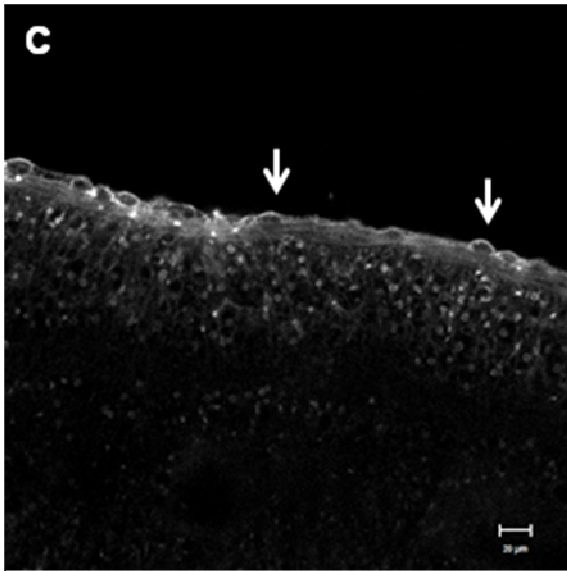
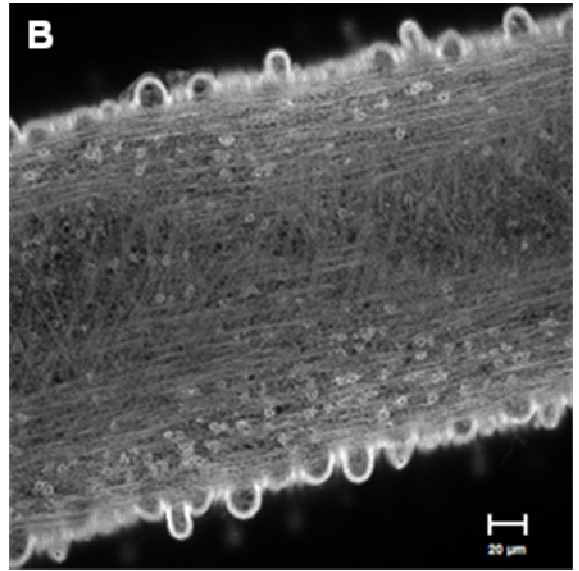
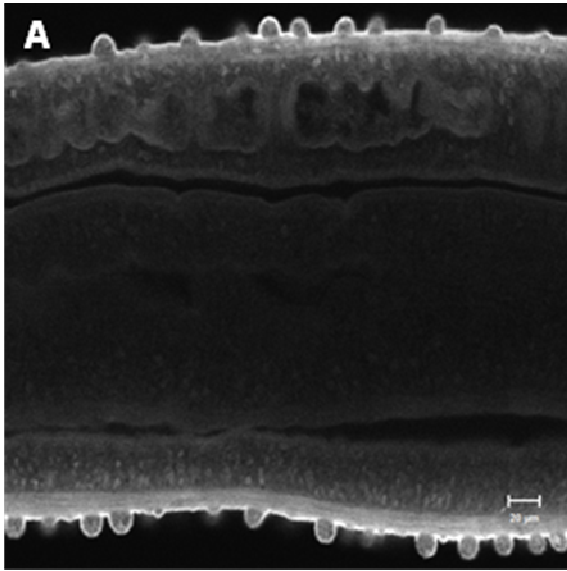


Figura 14: Fotomicrografias por microscopia de varredura laser confocal do tegumento de vermes adultos machos do isolado R de *Schistosoma mansoni*. Figuras A e B (grupo não tratado) apresentam distribuição normal, densidade de tubérculos na superfície do tegumento e a disposição das fibras musculares. Figura C e D (grupo tratado 250mg/Kg de PZQ) com diminuição do número e do tamanho dos tubérculos (seta branca) e contração das fibras musculares (cabeça de seta). Figuras E e F (grupo tratado 500mg/Kg de PZQ), indica a desorganização dos tubérculos (Tb) e fibras musculares (FM) frouxas.

4.3.2. Vermes adultos fêmeas do isolado R

Os vermes adultos fêmeas de *S. mansoni* dos grupos tratados com PZQ, apresentaram em geral menores danos tegumentares, somente alguns espécimes apresentaram vacuolização sub-tegumentar ou algum tipo de descamação tegumentar. Porém, observamos alterações no sistema reprodutor, como a diminuição do tamanho do ovário (Figura 15A) e ovário rudimentar (Figura 15B).

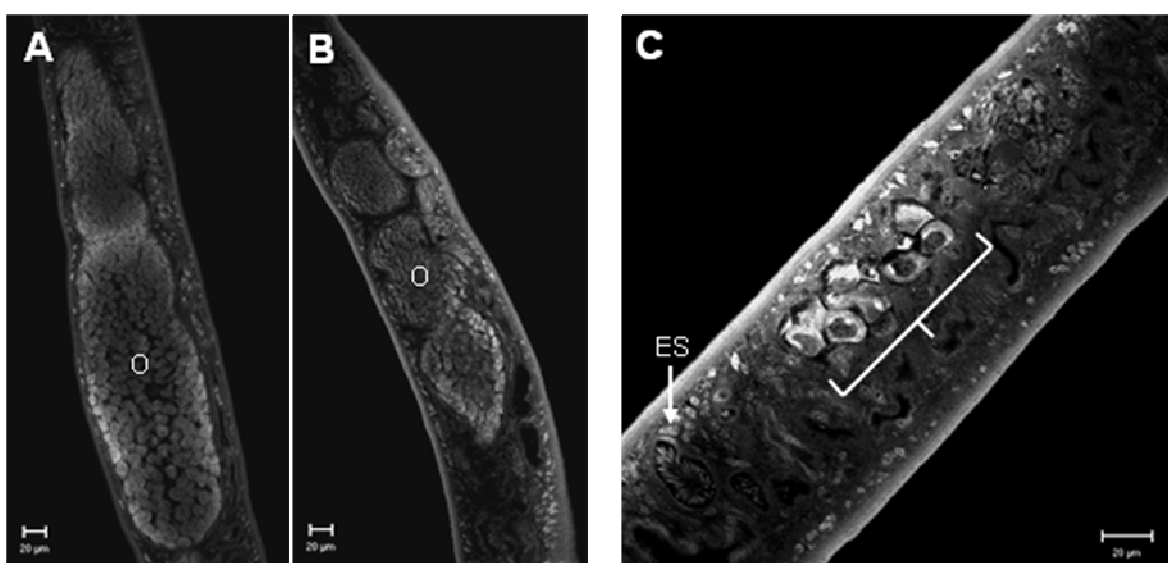


Figura 15: Fotomicrografias por microscopia de varredura laser confocal do sistema reprodutor de vermes adultos fêmeas do isolado R de *Schistosoma mansoni*. Figura A, ovário de helminto do grupo não tratado com aspecto normal. Figura B, ovário de helminto do grupo tratado com 250 mg/kg de PZQ, apresentando tamanho reduzido em relação ao não tratado. Na Figura C (grupo tratado 500mg/kg de PZQ), está destacado o ovário rudimentar. O (ovário), ES (espermateca).

4.3.3. Vermes adultos machos do isolado BH

O tegumento dos vermes do grupo não tratado apresentaram grande densidade de tubérculos, como apresentado nas Figuras 16 A e B. Porém o praziquantel, reduziu o número e o tamanho destas estruturas nas duas doses (250 e 500mg/kg de PZQ)

A alteração observada no sistema reprodutor foi a diminuição do conteúdo celular dos lobos testiculares (Figuras 17 C,D, E e F).

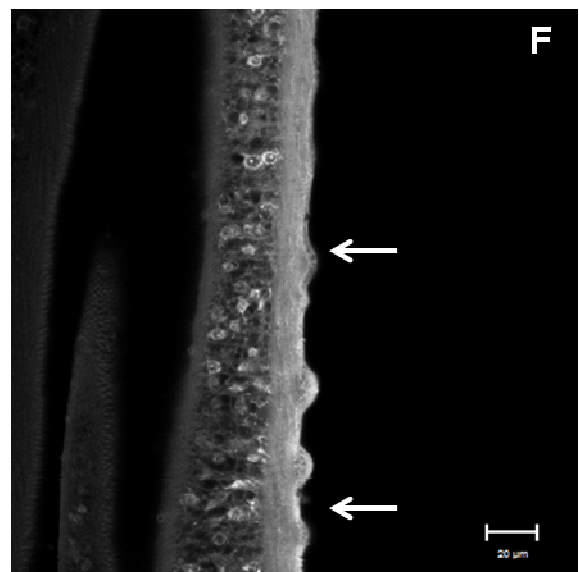
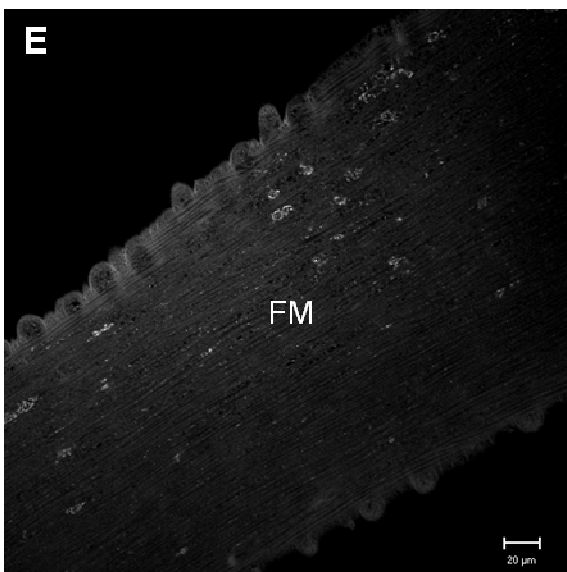
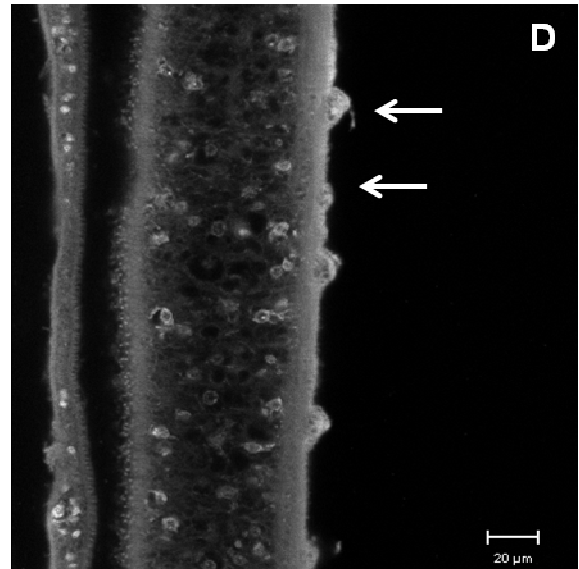
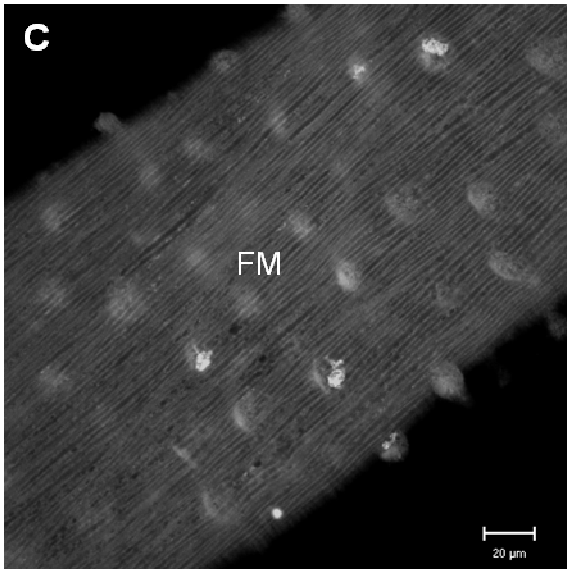
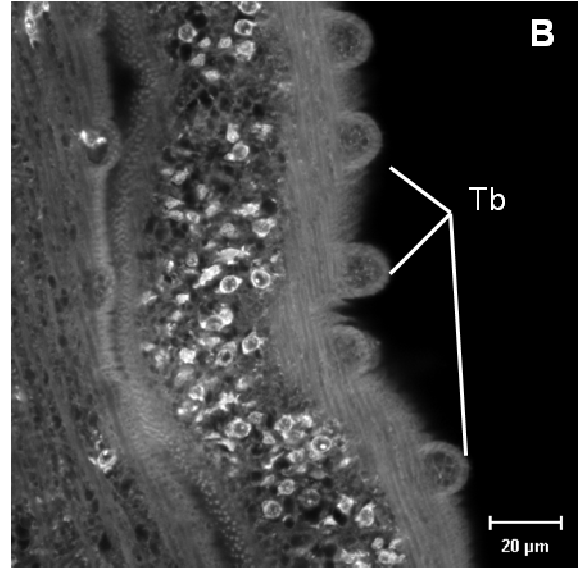
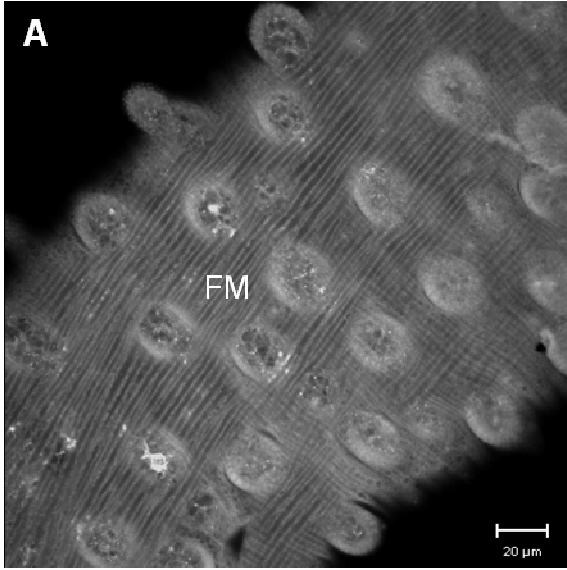


Figura 16: Fotomicrografias por microscopia de varredura laser confocal do tegumento de vermes adultos machos do isolado BH de *Schistosoma mansoni*. Figuras A e B (não tratados), mostrando a densidade, organização dos tubérculos e a disposição de fibras musculares normais. Figura C e D (tratados com 250mg/Kg de praziquantel) e Figuras E e F (tratados com 500mg/Kg de praziquantel), com tubérculos diminuídos e fibras musculares (FM). As setas indicam tubérculos (Tb) com tamanho reduzido.

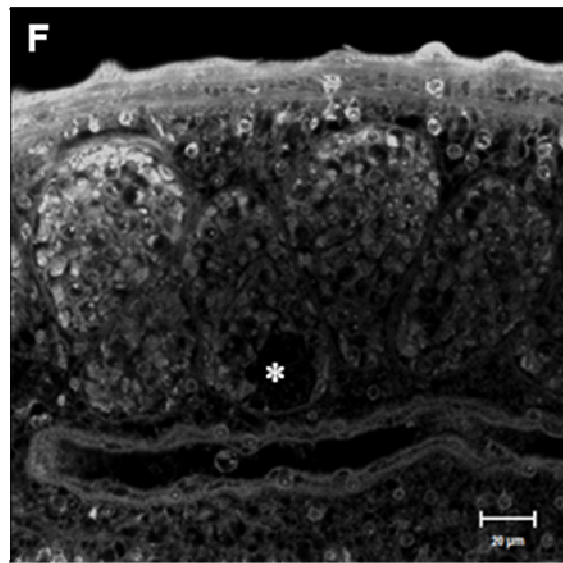
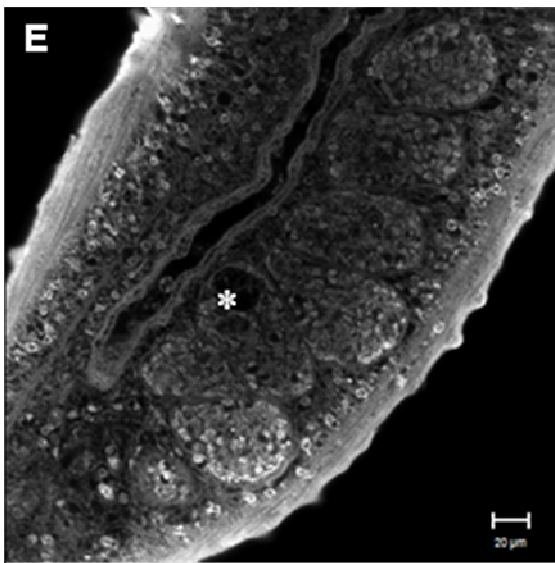
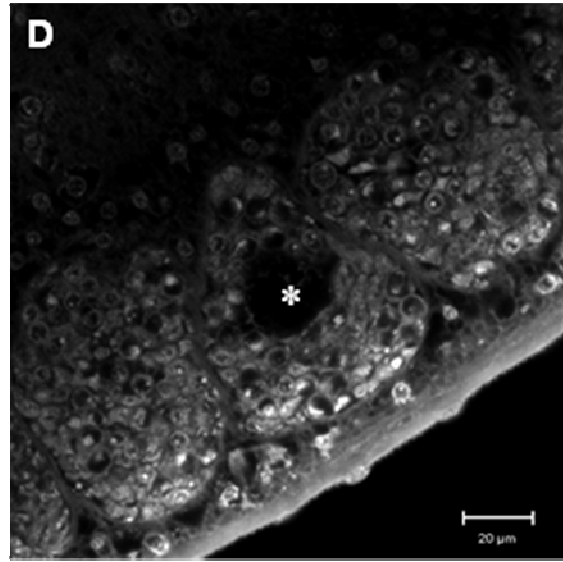
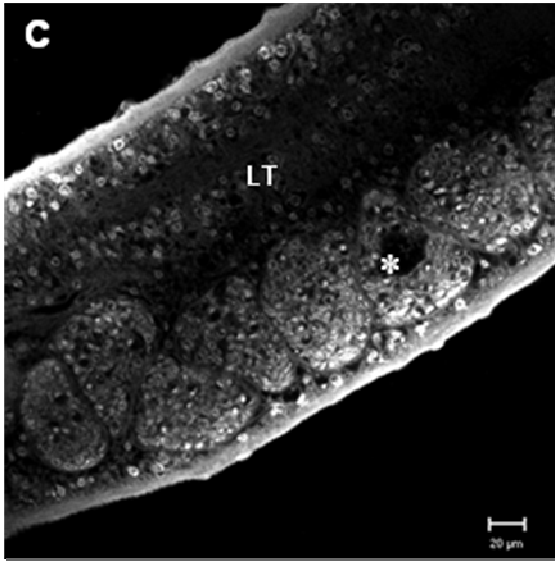
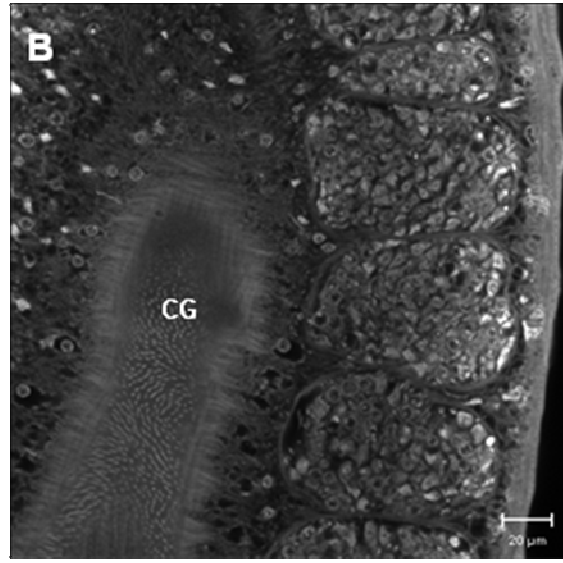
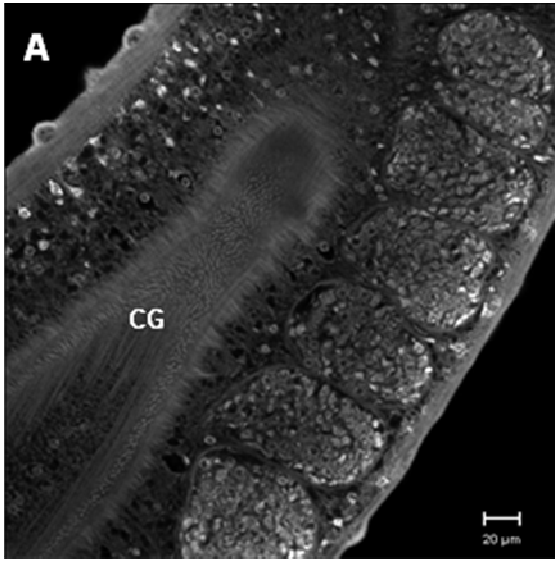


Figura 17: Fotomicrografias por microscopia de varredura laser confocal do sistema reprodutor de vermes adultos machos do isolado BH de *Schistosoma mansoni*. Figuras A e B (não tratados), apresentando densidade característica de células em todos os lobos testiculares (LT) e canal ginecóforo com espinhos (CG). Figuras C e D (tratados com 250mg/kg de praziquantel) e Figuras E e F (tratados com 500mg de praziquantel, apresentando diminuição do conteúdo celular dos lobos testiculares (*).

4.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

4.4.1. Vermes adultos machos do isolado R

Os vermes do grupo não tratado apresentaram as ventosas (oral e ventral) bem desenvolvidas, (Figura 18A) com aspecto característico da superfície do corpo recoberta de tubérculos (Figura 18B). Os vermes tratados com 250 mg/kg da praziquantel apresentaram contração na ventosa ventral (Figura 18C) e erosões no tegumento, (Figura 18D) enquanto naqueles tratados com 500 mg/kg houve também contração da ventosa ventral, alteração no aspecto da ventosa oral (Figura 18E) e mantiveram-se as erosões do tegumento (Figura 18F).

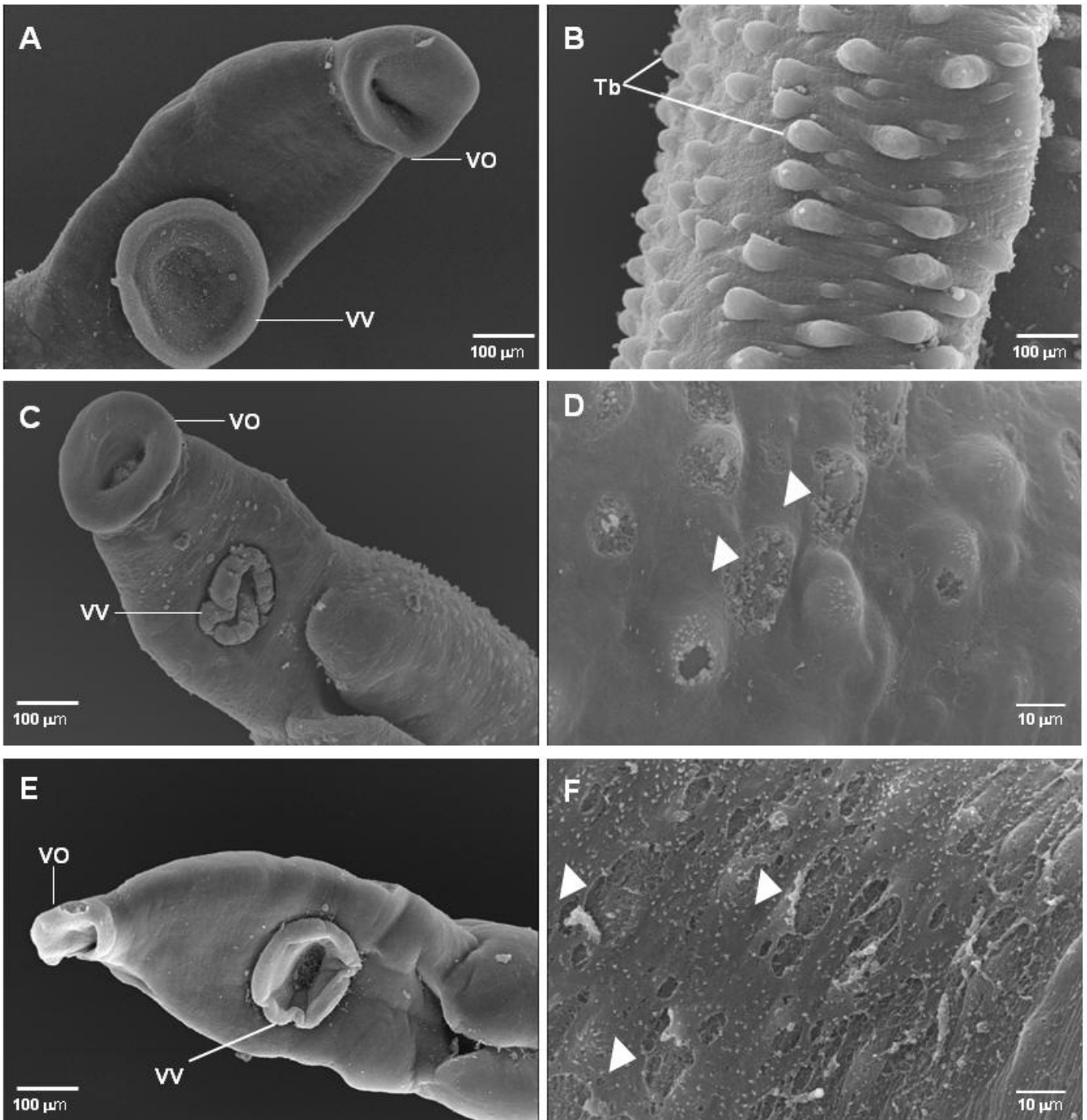


Figura 18: Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos machos do isolado R de *Schistosoma mansoni*. Figuras A e B (grupo não tratado), apresentando aspecto normal das ventosas (VO e VV) e tubérculos (Tb) no tegumento. Figuras C e D (tratados com 250mg/kg de praziquantel) com contração na ventosa ventral (VV) e erosões no tegumento (cabeça de seta). Figuras E e F (tratados com 500mg/kg de praziquantel) com alteração nas ventosas e erosões (cabeça de seta).

4.4.2. Vermes adultos fêmeas do isolado R

Os espécimes adultos fêmeas foram menos sensíveis ao praziquantel no que diz respeito ao dano tegumentar. Porém algumas fêmeas do grupo tratado com praziquantel apresentaram certa descamação tegumentar (Figura 19B). As ventosas (oral e ventral) de fêmeas do grupo controle apresentaram aspecto normal (Figura 19A). Algumas fêmeas do grupo tratado apresentaram contração da ventosa ventral (Figura 19B).

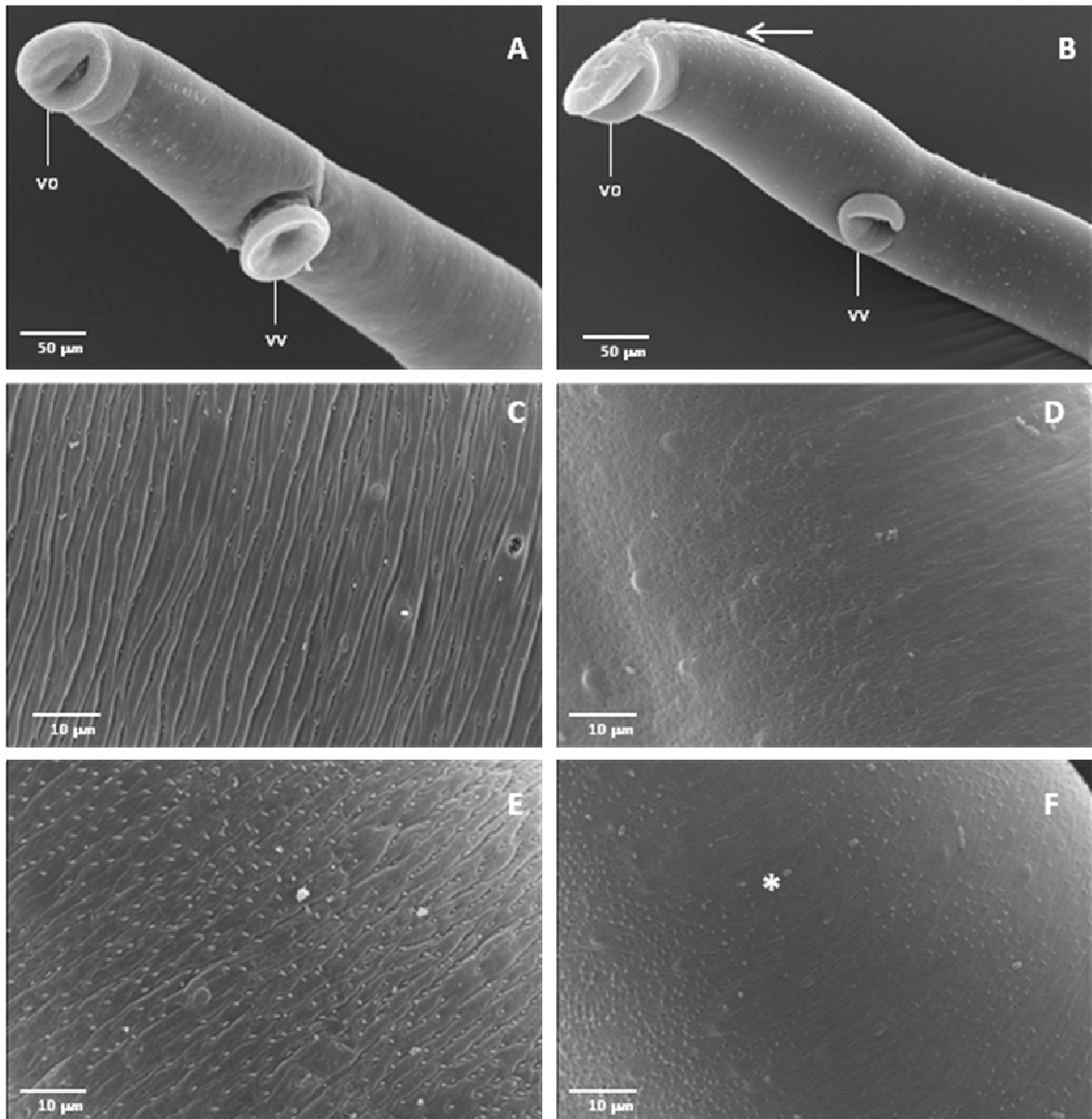


Figura 19: Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos fêmeas de *Schistosoma mansoni* do isolado R. Figuras A (grupo não tratado) ventosas apresentando aspecto normal (VO e VV). Figura B (grupo tratado com 250mg/kg de PZQ) apresenta descamação na região dorsal, na altura da ventosa oral (VO) e a ventosa ventral (VV) se apresenta um pouco contraída. Figuras C (não tratado) e D (tratado com 250mg/kg de PZQ) apresenta aspecto do tegumento na região média do corpo do helminto. As Figuras E (não tratado) e F (tratado com 250mg/Kg de PZQ), apresentam o aspecto da região posterior do corpo do helminto, em F o asterisco demarca a diminuição de espinhos.

4.4.3. Vermes adultos machos do isolado BH

Com relação às alterações nas estruturas de fixação (ventosas), os vermes provenientes dos grupos tratados apresentaram contração das ventosas (Figura 20C e E) ventrais.

O grupo tratado com a dosagem de 250mg/kg de PZQ apresentou significativo dano tegumentar, mostrando intensa erosão do tegumento (Figura D). Além disso, alguns vermes apresentaram tumefações tegumentares (Figura 20F).

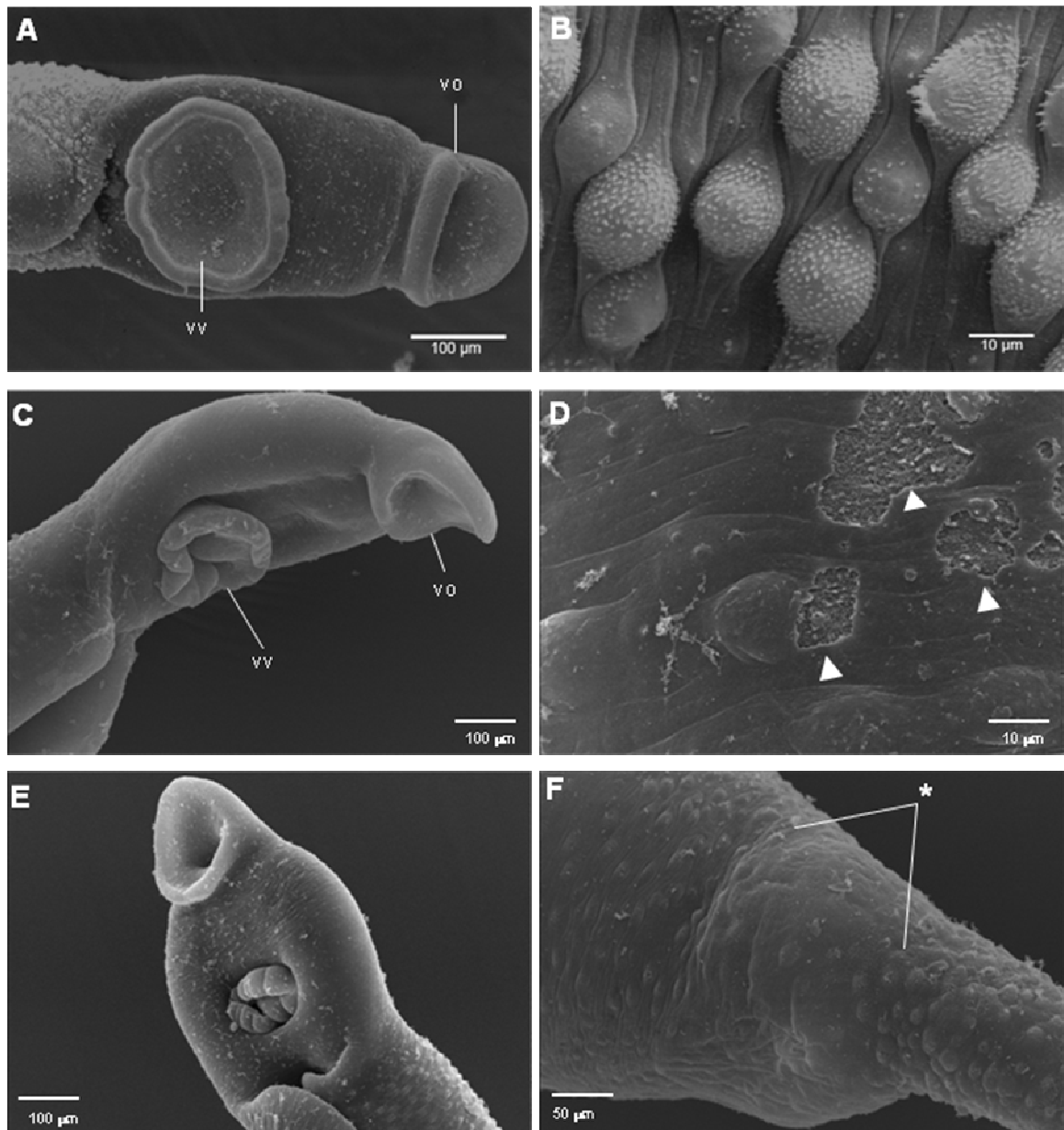


Figura 20: Fotomicrografias por microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos machos do isolado BH de *Schistosoma mansoni*. Figuras A e B (grupo não tratado), apresentando ventosas (VO e VV) de aspecto normal e tubérculos (Tb) na superfície do tegumento. Figuras C e D (grupo tratado com 250mg/Kg de PZQ). Figura C apresenta contração da ventosa ventral (VV). Figura D apresenta erosão do tegumento (cabeça de seta). Figuras E e F (grupo tratado com 500mg/Kg de PZQ). Na Figura E a ventosa ventral

5. DISCUSSÃO

O praziquantel (PZQ) se tornou a droga de escolha para o tratamento da esquistossomose devido à suas principais características, como a frequência baixa de efeitos colaterais e tóxicos e, a atividade curativa nas três espécies principais que parasitam o homem, a facilidade de administração e o custo relativamente baixo (Doenhoff et al., 2002; Cioli et al., 2004; Doenhoff et al., 2008). Estudos experimentais mostram que o PZQ é efetivo contra a infecção em hamsters, *Mastomys* e macacos *Cebus* (Webbe & Andrews, 1977, Pellegrino et al., 1977). Estudos nossos não publicados e de Gentile et al., (2011) demonstraram a eficácia do PZQ na infecção com a cepa BH de *S. mansoni* em *N. squamipes*. Portanto, o presente estudo é o primeiro a avaliar os efeitos do PZQ contra uma cepa de *S. mansoni* isolada de um roedor naturalmente infectado. Tal investigação é importante porque roedores da família Sigmondontinae podem atuar como reservatórios de *S. mansoni*, podendo dificultar os programas de controle da esquistossomose (Rey, 1993, Peralta et al., 2009). Outra contribuição deste estudo é que o isolado utilizado é originado de uma região em que há uma correlação positiva entre a prevalência de infecção nos roedores e as populações humanas (D'Andrea et al., 2000).

Nesse estudo, os possíveis efeitos decorrentes do efeito do PZQ foram avaliados por critérios biológicos, morfológicos e morfométricos. A obtenção de um isolado de roedores silvestres em camundongos de laboratório foi o primeiro passo para novos testes da susceptibilidade dos esquistossomicidas. É interessante que o isolado derivado de *N. squamipes* foi adaptado aos camundongos Swiss Webster com base na cinética da produção de ovos nas fezes e dados de perfusão, que revelaram a maturação entre 56 e 60% em oito semanas na cepa de camundongos C3H/He (Freire et al., 2003).

O padrão-ouro para diagnóstico da infecção esquistossomótica é a detecção de ovos nas fezes. Mudanças nos padrões de eliminação de ovos de *Schistosoma* são os principais critérios utilizados para determinar a eficácia da droga, em termos de taxa de cura e/ou taxa de redução de ovos (Doenhoff et al., 2008). A análise de amostras fecais, pode não revelar ovos devido a uma série de fatores, incluindo o nível de infecção, o que influencia os limites da sensibilidade da técnica do exame (Berhe et al., 2004, Gonçalves et al., 2006). Neste estudo, visando diminuir a limitação do diagnóstico, foram realizados vários exames de fezes (Wilson et al., 2006)

O exame do material fecal, através da técnica de Kato-Katz demonstrou um aumento inicial na eliminação de ovos entre a sexta e a sétima semana pós infecção, o que diminuiu

após a administração de PZQ aos camundongos. Estes resultados são semelhantes aos relatos de outros ensaios terapêuticos (Lescano et al., 2004).

Em condições de laboratório, a eficácia do tratamento em infecção madura também pode ser avaliada pela redução da carga de vermes e mudanças no oograma (Pellegrino et al., 1977; Botros et al., 2004, Araújo et al., 2008). Os protocolos de doses de PZQ utilizados no presente estudo causaram uma redução significativa da carga parasitária e modificações no padrão de oograma, com a melhor eficácia alcançada com a dose mais elevada (500mg/kg).

PZQ foi mais eficaz contra o isolado BH do que o isolado R. O isolado BH se apresentou mais sensível ao PZQ (Drescher et al., 1993). Contudo, diferenças na susceptibilidade ao PZQ também foram relatados entre isolados de origem geográficas diferentes (Fallon et al., 1997), entre isolados mantidos por longo período em laboratório e os de infecções humanas (Melman et al., 2009). As principais considerações para essa diferença é que isolados de campo do Brasil são mais diversificadas do que isolados mantidos por longo período em laboratório (Rodrigues et al., 1992). Uma possível explicação é que os isolados de campo diminuem a variabilidade devido à perda de alelos, após passagem em hospedeiro murino (Loverde et al., 1985). O período de tempo que cada isolado foi mantido sob condições de laboratório é provavelmente a razão para tais diferenças entre os isolados.

Nosso estudo in vivo mostrou uma sensibilidade maior de vermes machos do isolado R, inferida a partir dos dados da proporção de sexos, Que foi maior no sexo masculino (4:1 grupo, não tratado) e diminuiu para uma 1:1 relação macho/fêmea em camundongos expostos a uma dose mais alta (500mg/kg) de PZQ. Nossas observações encontram suporte anterior (Gonnert & Andrews, 1977), mas outros estudos demonstraram uma ação preferencial do PZQ em vermes fêmeas. (Delgado et al., 1992).

A avaliação do oograma mostrou uma menor percentagem de ovos imaturos e maduros e uma maior porcentagem de ovos mortos nos grupos tratados quando comparado aos animais do grupo não tratado. No entanto, não há dúvida sobre os efeitos do PZQ em vermes adultos (Doenhoff et al., 2008). O efeito de uma dose dupla de PZQ em ovos maduros tem sido relatada (Giboda & Smith, 1994). Esta é uma questão importante porque somente ovos maduros podem atravessar a parede do intestino e serem excretados com as fezes do hospedeiro (Giboda & Smith, 1994). A possível explicação é que altas doses de PZQ poderiam estar agindo sobre o sistema reprodutivo das fêmeas. Nesta situação, adicional poderia exibir a capacidade de desenvolvimento baixo ou as dosagens utilizadas foram suficientes, pois atuam no ovo maduro, conforme relatado anteriormente (Giboda & Smith, 1994). Este comprometimento não pode levar à morte do embrião dentro do ovo. Estudos

morfológicos que podem avaliar alterações no sistema reprodutivo (Shaw & Erasmus, 1988, Neves et al., 2004) de vermes adultos estão em andamento. Curiosamente, foram realizados estudos morfológicos através de microscopia de varredura laser confocal para a determinação da viabilidade de ovos (Holtfreter et al., 2011) e os critérios funcionais como a marcação dos ovos com sondas fluorescentes como, Hoechst 33258 (Sarvel et al., 2006) e histopatologia do intestino (Conceição et al., 2008) que podem fornecer informações importantes sobre esta questão. Nossas descobertas indicam que o isolado silvestre de *N. squamipes* é susceptível ao praziquantel e sugerem o uso da quimioterapia para hospedeiros não humanos infectados naturalmente por *S. mansoni*. Apesar dos órgãos oficiais da saúde pública considerarem a melhor estratégia de controle da esquistossomose o tratamento da população humana infectada, o significado epidemiológico da presença de roedores silvestres infectados precisa ser considerado.

Ainda não há confirmação sobre o mecanismo exato de ação do praziquantel, que desregula os mecanismos que controlam o fluxo de cátions, através das membranas celulares dos vermes, inibindo as enzimas que mantêm os gradientes de íons inorgânicos. Segundo Fallon et al., (1996) e Sabah et al., (1986) a atividade do PZQ é estágio dependente. Parasitos com 2-4 semanas de idade são menos susceptíveis ao PZQ que parasitos mais jovens (1-2 semanas de idade) ou parasitos maduros com mais de cinco semanas de idade.

Na literatura há limitação nos dados sobre a avaliação dos efeitos do PZQ pela análise morfológica por microscopia de campo claro e morfometria. Nesse sentido, nossos dados trouxeram contribuições a este tema, à medida que foram identificadas alterações, principalmente, no sistema reprodutor dos espécimes machos e fêmeas. Assinale-se que tais alterações ocorreram em ambos isolados testados, onde BH tem sido apontado como susceptível (Drescher et al., 1993). Outro aspecto não suficientemente analisado anteriormente foi a aplicação de microscopia de varredura laser confocal para avaliar os efeitos do esquistossomicida, no que se refere às características da superfície externa e, principalmente, do sistema reprodutor. Estudos anteriores do grupo já demonstravam a importância dessa técnica no estudo morfológico (Neves et al., 2007). Assim, evidenciamos pela primeira vez alterações nesses parâmetros como no caso do sistema reprodutor que podem explicar a drástica redução na produção de ovos ou mesmo a sua eliminação nas fezes detectada no estudo biológico.

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica bem estudada para avaliar os efeitos de esquistossomicidas sobre a superfície dos vermes adultos. Após o contato com o praziquantel, há degeneração do tegumento do verme, que se apresenta coberto por lesões

vacuolares que se assemelham a bolhas no tegumento. Os nossos resultados confirmaram que os isolados estudados apresentaram alterações nas ventosas como contração e lesões do tipo de descamação no tegumento, principalmente nos vermes machos, como tem sido apontado na literatura (Mourão et al., 2005; Jiraunkoorskul et al., 2005). PZQ estimula a entrada de sódio e inibe a de potássio, ocasionando despolimerização nas células do parasito. Além disso, ativa de maneira direta ou indireta, a contração cálcio-dependente da musculatura do parasito, devido ao rápido aumento da passagem de cálcio para o interior do parasito, com elevação do tônus muscular. Isso ocasiona uma forte contração muscular que imobiliza o verme, segundos após seu contato com praziquantel. Como consequência, os helmintos deixam de se fixar e são rapidamente deslocados das veias mesentéricas para o fígado (Novaes et al., 1999). A alteração do tegumento do parasito revela antígenos, antes escondidos na superfície do verme, tornando-o alvo do sistema imune (Ribeiro et al., 2004).

6. CONCLUSÕES

- 1- O isolado murino, proveniente de *Nectomys squamipes* se mostrou suscetível ao praziquantel.
- 2- O isolado BH foi mais suscetível que o R.
- 3- O praziquantel atua no tegumento e no sistema reprodutor de vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni*.
- 4- Os vermes adultos machos apresentaram mais alterações morfológicas do que os vermes fêmeas de *S. mansoni*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alarcón de Noya B, Pointier JP, Colmenares C, Théron A, Balzan C, Cesari IM, González S, Noya O 1997. Natural *Schistosoma mansoni* infection in wild rats from Guadeloupe: parasitological and immunological aspects. *Acta Trop* 68: 11-21.
- Amorim JP 1953. Infestação experimental e natural de murídeos pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev Bras Malariol Doenç Trop* 5: 219-222.
- Andrews P, Thomas H, Pohlke R, Seubert J 1983. Praziquantel. *Med Res Ver* 3: 147-200.
- Antunes CMF, Milward-De-Andrade R, Katz N, Coelho PMZ 1971. Contribuição para o conhecimento do "rato lava-pés", *Nectomys squamipes squamipes*, na epidemiologia da esquistossomose mansoni (Rodentia:Cricetidae). *Rev Bras Malariol Doenç Trop* 23: 203-204.
- Araújo N, Mattos ACA, Sarvel AK, Coelho, PMZ, Katz N 2008. Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103, 450-454.
- Barbosa FS, Barbosa I, Arruda F 1962. *Schistosoma mansoni*: Natural infection of cattle in Brazil. *Science* 138: 831.
- Berhe N, Medhin G, Erko B, Smith T, Gedamu S, Bereded D, Moore R, Habte E, Redda A, Gebre-Michael T, Gundersen SG 2004. Variations in helminth faecal egg counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica* 92: 205-212.
- Bonesso-Sabadini PI, Dias LCS 2002. Altered response of strain of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 381-385.

- Bonvicino CR, Lindbergh SM, Maroja LS 2002. Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic forest and Cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Braz J Biol* 62: 765-774.
- Botros S, William S, Ebeid F, Cioli, D, Katz N, Day TA, Bennett JL 2004. Lack of evidence for an antischistosomal activity of myrrh in experimental animals. *Am J Trop Med Hyg* 71: 206-210.
- Camargo S 1980. Impacto do desenvolvimento na expansão da esquistossomose. *Rev. Inst Med Trop São Paulo* 22: 117-119.
- Carvalho DM 1982. Sobre a importância do *Nectomys squamipes* na epidemiologia da esquistossomose mansônica no município de Sumidouro, RJ. Dissertação de Mestrado. Escola Nacional de Saúde Pública, *Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 88 pp.*
- Chitsulo L, Engels D, Montresor A, Savioli L 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* 77: 41-51.
- Cioli D, Pica-Mattoccia L 2003. Praziquantel. *Parasitol Res* 90: 3-9.
- Cioli D, Botros S, Wheatcroft-Francklow K, Mbaye A, Southgate V, Tchuenté TLA, Pica-Mattoccia L, Troiani RA, el-Din SHS, Abdel-Nasser As, Albin J, Engels D, Doenhoff MJ 2004. Determination of ED₅₀ values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *Int J Parasitol* 34: 979-987.
- Coelho PMZ, Lima e Silva FC, Nogueira-Machado JA 1997. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* strain isolated from patient submitted to repeated treatments. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 39: 101-106.
- Combes C 1990. Where do human schistosomes come from? An evolutionary approach. *Tree* 10: 334-337.
- Conceição MJ, Argento CA, Corrêa A 2000. Study of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with failure of treatment with oxamniquine. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95: 375-380.

- Conceição MJ, Lenzi HL, Coura JR 2008. Human study and experimental behavior of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with different clinical forms of schistosomiasis. *Acta Tropica* 108: 98-103.
- Costa-Silva M, Rodrigues-Silva R, Hulstijn M, Neves RH, Panasco MS, Lenzi HL, Machado-Silva JR. 2002. Natural *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes*: Histopathological and morphometric analysis in comparison with experimentally infected *N. squamipes* and C3H/He mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 129-142.
- D'Andrea PS, Maroja LS, Gentile R, Cerqueira R, Maldonado JR. A, Rey L 2000. The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea: Trematoda) in a naturally infected population of water rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia: Sigmondontinae) in Brazil. *Parasitology* 120: 573-582.
- D'Andrea, OS Fernandes FA, Cerqueira R, Rey L 2002. Experimental evidence and ecological perspectives for the adaptation of *Schistosoma mansoni* Sambom, 1907 (Digenea: Schistosomatidae) to a wild host, the water-rat, *Nectomys squamipes* Brants, 1827 (Rodentia: Sigmodontinae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97 (Suppl): 11-14.
- D'Andrea PS, Gentile R, Maroja LS, Fernandes FA, Coura R, Cerqueira R 2007. Small mammal populations of an agroecosystem in the Atlantic Forest domain, southeastern Brazil. *Braz J Biol* 67: 179-186.
- Davies SJ, McKerrow JH 2003. Developmental plasticity in schistosomes and other helminths. *Int J Parasitol* 33: 1277-1284.
- Delgado VS, Suárez DP, Cesari LM, Incani RN 1992. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains and on both sexes of the parasite. *Parasitol Res* 78: 648-654.
- De Souza W 2007. Técnicas de Microscopia Eletrônica Aplicada às Ciências Biológicas. Sociedade Brasileira de Microscopia, Rio de Janeiro, RJ.

- Dias LC, Pedro RJ, Rigo E, Goto MM, Mafra GL 1978. A human strain of *Schistosoma mansoni* resistant to schistosomicides. *Rev Saude Publica* 12: 110.
- Doenhoff MJ, Kusel JR, Coles GC, Cioli D 2002. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Trans R Soc Trop Med Hyg* 96: 465-469.
- Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis* 21: 659-667.
- Drescher K, Rogers EJ, Bruce JI, Katz N, Dias LC, Coles GC, 1993. Response of drug resistant isolates of *Schistosoma mansoni* to antischistosomal agents. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88: 89-99.
- Ellery AW 1985. Guidelines for specification of animals and husbandry methods when reporting the results of animal experiments. Working Committee for the Biological Characterization of Laboratory Animals/GV-SOLAS. *Lab animal* 19(2): 106-108
- Fallon PG, Tao LF, Ismail MM, Bennett JL 1996. Schistosome Resistance to praziquantel: Fact or artifact? *Parasitol Today* 12: 316-320.
- Fallon PG, Mubarak JS, Fookes RE, Niang M, Butterworth AE, Sturrock F, Doenhoff MJ, 1997. *Schistosoma mansoni*: Maturation rate and drug susceptibility of different geographic isolates. *Exp Parasitol* 86: 29-36.
- Ferrari MLA, Coelho PMZ, Antunes CMF, Tavares CAP, Cunha AS 2003. Efficacy of oxaminiquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. *Bull WHO* 81: 190-196.
- Freire N 1987. Estudo comparativo entre duas amostras de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 isoladas de roedores e humanos em Sumidouro, Estado do Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biologia, UFRJ.

- Freire N, Machado-Silva JR, Rodrigues-Silva R, Rey L 2002. Cercarial chaetotaxy and sex differentiation of *Schistosoma mansoni* deriving from humans and *Nectomys squamipes* (Muridae: Sigmondontinae) in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 97: 127-132.
- Freire N, Rodrigues-Silva R, Machado-Silva JR, Rey L 2003. A comparative parasitologic study on *Biomphalaria glabrata* snail and C3H/He mice infected with human and murine isolates of *Schistosoma mansoni* derived from Sumidouro, Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98: 783-787.
- Gentile R, Gonçalves MM, Neto SFC, Costa MM, Peralta RH, Peralta JM 2011. Evaluation of immunological, parasitological and molecular methods for the diagnosis of *Schistosoma mansoni* infection before and after chemotherapy treatment with praziquantel in experimentally infected *Nectomys squamipes*. *Vet Parasitol* 25:180(3-4):243-9.
- Giboda M, Smith JM, 1994. *Schistosoma mansoni* eggs as a target for praziquantel: efficacy of oral application in mice. *J Trop Med Hyg* 97: 98-102.
- Gonçalves MM, Barreto MG, Peralta RH, Gargioni C, Gonçalves T, Igreja RP, Soares MS, Peralta, JM, 2006. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. *Acta Tropica* 100: 24-30.
- Gonnert R, Andrews P, 1977. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Z Parasitenkd* 52: 129-150.
- Holtfreter MC, Stachs O, Reichard M, Loebermann M, Guthoff RF, Reisinger EC 2011. Confocal laser scanning microscopy for detection of *Schistosoma mansoni* eggs in the gut of mice. *PLoS ONE* 6: e18799.
- Jiraungkoorskul W, Sahaphong S, Sobhon P, Riengrojpitak S, Kangwanransan N 2005. Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice *Parasitol Int* 54(3):177-83.

- Kastner MRQ, Kohn A, Teixeira ED, Pitanga LC 1975. *Estudo morfológico do Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 encontrado na espécie humana. *Rev Soc Bras Med Trop* 9: 247- 261.
- Katz N, Chaves A, Pellegrino J 1972. A simple device for quantitative stool thicksmear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 14: 397-402.
- Katz N, Antunes CM, Zicker F 1973. Clinical trials with pyrantel pamoate on intestinal helminths on urban and rural areas. *Rev Inst Med Trop, São Paulo* 15: 331-339.
- Katz N, Rocha RS, Chaves A 1979. Preliminary trials with praziquantel in human infections due to *Schistosoma mansoni*. *Bull Wld Hlth Org* 57:781-785.
- Katz N, Peixoto SV 2000. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Rev Soc Bras Med Trop* 33 (3): 303-308.
- Lenzi J, Mota EM, Pelajo-Machado M, Paiva RAN, Lenzi HL 1995. *Calomys callosus*: an alternative model to study fibrosis in schistosomiasis mansoni. The pathology of acute phase. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 90: 311-318.
- Lenzi HL, Romanha WS, Machado MP, Mota EM, Lenzi JA. Patologia experimental com enfoque no granuloma esquistossomótico In *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose uma visão multidisciplinar. Editora Fiocruz 2008, Rio de Janeiro. p. 550-654.
- Lescano SZ, Chieffi PP, Canhassi RR, Boulos M, Amato Neto V 2004. Antischistosomal activity of artemether in experimental schistosomiasis mansoni. *Rev Saúde Publica* 38: 71-75.
- LoVerde PT, DeWald J, Minchella DJ, Bosshardt SC, Damian RT 1985. Evidence for host-induced selection in *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 71: 297-301.
- Machado-Silva JR 1981. Observações sobre a evolução de diferentes amostras de *Schistosoma mansoni* em *Biomphalaria glabrata* e *Mus musculus*. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. 103 pp.

- Machado-Silva JR, Oliveira RMF, Rodrigues-Silva R, Maldonado JR A, Rey L 1991. Roedores silvestres como modelos experimentais da esquistossomose mansônica: *Akodon arviculoides* (Rodentia: Cricetidae). *Rev Inst Med Trop São Paulo* 33: 257-261.
- Machado-Silva JR, Galvão C, Oliveira RMF, Presgrave OAF, Gomes DC 1995. *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907: comparative morphological studies of some Brazilian strains. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 37: 441-443.
- Machado-Silva JR, Lanfredi RM, Gomes DC 1997. Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* by scanning electron microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92: 647-653.
- Machado-Silva JR, Pelajo-Machado M, Lenzi HL, Gomes DC 1998. Morphological study of adult male worms of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 by confocal laser scanning microscopy. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 Suppl 1: 303-307.
- Magalhães LSA, Alcântara FG, Carvalho JF 1975. Alguns dados referentes ao estudo parasitológico e anatopatológico de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. *Rev Saúde Púb São Paulo* 9: 1-5.
- Magalhães LSA, Carvalho JF 1976. Sobre o comportamento de duas linhagens de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907. Proposição para um método de estudo quantitativo. *Rev Soc Bras Med Trop* 10: 169-194.
- Maldonado JR. A, Machado-Silva JR, Rodrigues-Silva R, Lenzi HL, Rey L 1994. Evaluation of the resistance to *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes* (Rodentia:Cricetidae), a natural host of infection in Brazil. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 36: 303-307.
- Martinez EM 1998. Suscetibilidade experimental de *Nectomys squamipes*, possível reservatório silvestre de esquistossomíase, a cepas de *Schistosoma mansoni*: avaliação parasitológica. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro. 66 pp.

- Melman SD, Steinauer ML, Cunningham C, Kubatko LS, Mwangi IN, Wynn NB, Mutuku, MW, Karanja DM, Colley DG, Black CL, Secor WE, Mkoji GM, Loker ES 2009. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 3 (8): e504.
- Melo OG, Coelho PMZ. *Schistosoma mansoni* e a doença. In Neves DP. Parasitologia Humana. 11º ed. Atheneu, 2004 São Paulo. p. 193 - 212.
- Modena CM, Lima WS, Coelho PM, 2008. Wild and domesticated animals as reservoirs of schistosomiasis mansoni in Brazil. *Acta Tropica* 108: 242-244.
- Morand S, Pointier JP, Théron A 1999. Population biology of *Schistosoma mansoni* in the black rat: host regulation and basic transmission rate. *Int J Parasitol* 29: 673-684.
- Mourão SC, Costa PI, Salgado HRN, Gremião MPD 2005. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. *Int J Phar* 295: 157-162
- Nelson GS 1960. Schistosome infections as zoonoses in Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 54: 301-24.
- Neves RH, Pereira MJS, Gomes DC, Oliveira RMF, Machado-Silva JR 1998. Morphometric differences of adult worms from sympatric samples of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 isolated from rodents and humans. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93 (suppl. 1): 309-312.
- Neves RH, Costa-Silva M, Martinez EM, Branquinho TB, DE Oliveira RM, Lenzi HL, Gomes DC, Machado-Silva JR 2004. Phenotypic plasticity in adult worms of *Schistosoma mansoni* (Trematoda:Schistosomatidae) evidenced by brightfield and confocal laser scanning microscopies. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99(2): 131-6.
- Neves RH, Biolchini CL, Machado-Silva JR, Carvalho JJ, Baranquinho TB, Lenzi HL, Hulstjin M, Gomes DC 2005. A new description of the reproductive system of *Schistosoma mansoni* (Trematoda: Schistosomatidae) analyzed by confocal laser scanning microscopy. *Parasitol Res* 95(1):43-9.

- Neves RH, Alencar ACMB, Águila MB, Mandarim-de-Lacerda CA, Machado-Silva JR, Gomes DC 2007. Light and confocal microscopic observations of adult *Schistosoma mansoni* from mice fed on a high-fat diet. *J Helminthol* 81(4):361-8
- Novaes MRCG, Souza JP, Araújo JPS 1999. Síntese do anti-helmíntico praziquantel, a partir da glicina. *Quím Nova* 22: 5-10.
- Paraense WL, Corrêa LR 1978. Differential susceptibility of *Biomphalaria tenagophila* populations to infection with a strain of *Schistosoma mansoni*. *J Parasit* 64: 822-826.
- Pellegrino J, Oliveira CA, Faria J, Cunha AS 1962. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. *Am J Trop Med Hyg* 11:201-215.
- Pellegrino J, Lima-Costa FF, Carlos MA, Mello RT 1977. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. XIII. Activity of praziquantel, an isoquinoline-pyrazino derivative, on mice, hamsters and Cebus monkeys. *Z Parasitenkd* 52: 151-168.
- Peralta RHS, Melo DS, Gonçalves MM, D'Andrea PS, Rey, Machado-Silva JR, Peralta JM, 2009. Serological studies in *Nectomys squamipes* demonstrate the low sensitivity of coprological exams for the diagnosis of schistosomiasis. *J Parasitol* 95: 764-766.
- Pica-Mattoccia L, Dias LC, Moroni R, Cioli D 1993. *Schistosoma mansoni*: genetic complementation analysis shows that two independent hycanthone/oxamniquine-resistant strains are mutated in the same gene. *Exp Parasitol* 77: 445-449.
- Pica-Mattoccia L, Cioli D 2004. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *Int J Parasitol* 34: 527-533.
- Picot H 1992. *Holochilus brasiliensis* and *Nectomys squamipes* (Rodentia:Cricetidae) natural hosts of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 255-260.
- Prata A 1957. Biopsia retal na esquistossomose mansoni. Bases e aplicações no diagnóstico e tratamento. Serviço Nacional de Educação Sanitária.

- Rey L 1993. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis transmission in Brazil. *Res Rev Parasit* 53: 13-25.
- Rey, L. Parasitologia, Ed. Guanabara Koogan – Quarta edição, 2008.
- Ribeiro AC, Maldonado JR. A, D'Andrea PS, Vieira GO, Rey L 1998. Susceptibility of *Nectomys rattus* (Pelzen, 1883) to experimental infection with *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907): a potential reservoir in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 93: 295-299.
- Ribeiro F, Mello T, Tavares CAP, Kusel JR, Coelho PMZ 2004. Synergistic action of praziquantel and host specific immune response against *Schistosoma mansoni* at different phases of infection. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 46: 231-233.
- Rodrigues-Silva R, Machado-Silva JR, Faerstein NF, Lenzi HL, Rey L 1992. Natural infection of wild rodents by *Schistosoma mansoni*. Parasitological aspects. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 271-276.
- Sabah AA, Fletcher C, Webbe G, Doenhoff MJ 1986. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infection of different ages. *Exp Parasitol* 61: 294-303.
- Sarvel AK, Kusel JR, Araujo N, Coelho PMZ, Katz N 2006. Comparison between morphological and staining characteristics of live and dead eggs of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101 (1): 289-292.
- Sarvel AK, Oliveira AA, Silva AR, Lima ACL, Katz N 2011. Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 5 (3): e990.
- Shaw MK, Erasmus, DA 1988. *Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced changes to the female reproductive system. *Exp Parasitol* 65: 31-42.

- Silva LM, Menezes RM, Oliveira SA, Andrade ZA 2003. Chemotherapeutic effects on larval stages of *Schistosoma mansoni* during infection and re-infection of mice. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 335-341.
- Silveira AC 1989. Controle da esquistossomose no Brasil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 84 (suppl 1): 91-95.
- Smithers SR, Terry RJ 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* 55: 695-700.
- Souza VAM, Rodrigues-Silva R, Maldonado JR A, Machado-Silva JR, Rey L 1992. *Nectomys squamipes* (Rodentia: Cricetidae) as an experimental model for schistosomiasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 87: 277-280.
- Standley CJ, Mugisha L, Verweij JJ, Adriko M, Arinaitwe M, Rowell C, Atuhaire A, Betson M, Hobbs E, van Tulleken CR, Kane RA, van Lieshout L, Ajarova L, Kabatereine NB, Russell Stothard RJ, 2011. Confirmed infection with intestinal schistosomiasis in semi-captive wild-born chimpanzees on Ngamba Island, Uganda. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11, 169-176.
- Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de vigilância epidemiológica / Ministério da Saúde, 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009. 816 p.
- Théron A, Pontier JP Combes C 1978. An ecological approach to the problem of the responsibility of men and rats in the workings of a transmission site of *Schistosoma mansoni* in Guadeloupe (Western Indies). *Ann Parasitol Hum Comp* 53: 223-234.
- Théron A 1984. Early and late shedding patterns of *Schistosoma mansoni* cercariae: ecological significance in transmission to human and murine hosts. *J Parasitol* 70: 652-655.
- Théron A, Pointier JP, Morand S, Imbert-Establet D, Borel G 1992. Long-term dynamics of natural populations of *Schistosoma mansoni* among *Rattus rattus* in patchy environment. *Parasitology* 104: 291-298.

- Tsai MH, Marx KA, Ismail MM, Tao L 2000. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) polymerase chain reaction assay for identification of *Schistosoma mansoni* strains sensitive or tolerant to anti-schistosomal drugs. *J Parasitol* 86: 146-149.
- Webbe G, James C 1977. A comparison of the susceptibility to praziquantel of *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. intercalatum* and *S. mattheei* in hamsters. *Z Parasitenkd* 52: 169-177.
- Wilson RA, van Dam, G, Kariuki TM, Farah IO, Deelder AM, Coulson PS 2006. The detection limits for estimates of infection intensity in schistosomiasis mansoni established by a study in non-human primates. *Vector Borne Zoonotic Dis* 36, 1241-1244.
- Xiao SH, Mei JY, Jiao PY 2009. The in vitro effect of mefloquine and praziquantel against juvenile and adult *Schistosoma japonicum*. *Parasitol Res* 106(1):237-46.

8. ANEXO

Manuscrito aceito para publicação na revista “Experimental Parasitology”:

Título: “Susceptibility of a Brazilian wild rodent isolate of *Schistosoma mansoni* to praziquantel in mice”.

Autores: Michele Costa-Silva, Lucas de Andrade Barros, Juberlan Silva Garcia, Renata Heisler Neves, Rosângela Rodrigues-Silva, José Roberto Machado-Silva, Arnaldo Maldonado-Júnior.

Susceptibility of a Brazilian wild rodent isolate of *Schistosoma mansoni* to praziquantel in mice

Michele Costa-Silva^{a,c}, Lucas de Andrade Barros^b, Juberlan Silva Garcia^a, Renata Heisler Neves^b, Rosângela Rodrigues-Silva^b, José Roberto Machado-Silva^c, Arnaldo Maldonado-Júnior^{a,*},¹.

^aLaboratory of Biology and Parasitology of Wild Mammal Reservoirs, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil.

^bLaboratory of Helminth Parasites of Vertebrates, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Av. Brasil 4365, Manguinhos, 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil. ^cRomero Lascasas Porto Laboratory of Helminthology, Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, School of Medical Sciences, Biomedical Center, Rua Prof. Manoel de Abreu 444/5^o floor, Vila Isabel, 20511-070, Rio de Janeiro, Brazil.

* A. Maldonado Júnior and J.R. Machado-Silva are Brazilian Council of Science and Technology (CNPq) fellowship

¹ to whom correspondence should be addressed

Tel: (+55.21) 25621272 Fax: (+55.21) 25621276

e mail: maldonad@ioc.fiocruz.br

Abstract

The therapeutic effects of praziquantel (PZQ) against a *Schistosoma mansoni* isolate derived from *Nectomys squamipes* (isolate R) and a susceptible isolate (BH) were analyzed in Swiss mice by fecal egg counting, adult worm reduction and oogram pattern. Infected mice were orally administrated with 62.5mg/kg (group 1), 125mg/kg (group 2), 250mg/kg (group 3) and 500mg/kg (group 4), each dose divided over 3 days (49, 50 and 51 days after infection). The data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). In regard to isolate R, no fecal eggs were observed with 250mg/Kg and 500mg/kg ($p < 0.05$), whereas BH excretion reached zero with all doses. Mean worm burden reduction was significantly ($p < 0.05$) higher at the two highest concentrations, regardless of isolate. At 62.5mg/kg, the percentage of immature eggs varied from 17% (isolate R) to 38% (isolate BH). At 125mg/kg, the percentage of immature eggs varied from 20% (isolate R) to 16% (isolate BH). At 250mg/kg, immature eggs dropped significantly to 1% (isolate R) and 4% (isolate BH). At 500mg/kg, no immature eggs were found in isolate R, whereas in BH was 8%. No dosage significantly ($p > 0.05$) affected the percentage of mature eggs, regardless of isolate. There was a large increase ($p < 0.001$) in the percentages of dead eggs in all treated groups of 62% and 64% in groups 3 and 4, respectively (isolate R). The percentage of dead eggs rose from 34% (group 1) to 58% (group 3) in isolate BH. Although group 4 showed lowest increase in the percentage of dead eggs (46%), it was higher ($p < 0.001$) compared to the 8% in the control. Our findings indicate that the wild isolate from *N. squamipes* is susceptible to PZQ and suggest the use of chemotherapy against schistosome parasites in naturally infected non-human hosts.

Key words: Praziquantel-Susceptibility-*Schistosoma mansoni*-Non-human host–

1. Introduction

Human schistosomiasis mansoni, caused by the blood dwelling fluke *Schistosoma mansoni*, is one of the most widespread neglected tropical water-borne diseases (Chitsulo, 2000), because inhabitants in these regions have frequent contact with contaminated water (Sarvel et al., 2011).

Although *S. mansoni* is primarily a parasite of humans, other primates (Nelson, 1960; Standley et al., 2011), bovines (Barbosa et al., 1962; Modena et al., 2008) and rodents can serve as reservoir hosts (Théron and Pointier, 1992; Alarcón de Noya et al., 1997). In Brazil, six aspects pertaining to the importance of *Nectomys squamipes* (water rat) in schistosomiasis transmission should be highlighted: i) this species is semi-aquatic; ii) its wide geographic range sometimes is coincident with *S. mansoni*-endemic areas (Bonvicino et al., 2002; D'Andrea et al., 2002); iii) fecal sample examination shows steady release of viable eggs (Antunes et al., 1973; Silva et al., 1992; Maldonado Jr. et al., 1994) for 14 weeks after experimental infection (Souza et al., 1992); iv) experimental studies show the susceptibility to several laboratory-bred *S. mansoni* stocks (Martinez et al., 2008); v) neither natural nor experimental infections excessively threaten the life span and reproductive capacity of this rat (D'Andrea et al., 2000); and vi) the existence of *N. squamipes* naturally infected by *S. mansoni* is a drawback for schistosomiasis control programs (Rey, 1993).

The possible methods available to control schistosomiasis have long been recognized as being improved water supply, implementation of basic sanitation measures, improvement of socioeconomic conditions, snail control and chemotherapy for human infections (WHO, 1993). In addition, the Chinese control program against schistosomiasis selected treatment of

animal hosts (bovines) with praziquantel (PZQ) (Chen, 2005). PZQ (2-cyclohexylcarbonyl-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino{2,1-a}isoquinoline-4-one) is the drug of choice for both public health campaigns and clinical use (Moreira et al., 2007).

Investigations based on reduction of egg excretion have shown that the cure rate can reach 85–90% (Doenhoff et al., 2009). Laboratory studies have demonstrated that mice sex, strain and worm burden do not influence efficacy rates (Gönnert and Andrews, 1977). Experimental studies have investigated the antischistosomal activity of PZQ on schistosomes derived from humans (Araújo et al., 1996; Fallon and Doenhoff, 1994). However, to our knowledge the susceptibility of isolates derived from wild rodents has not been investigated.

2. Material and methods

2.1. Fieldwork area

The fieldwork was conducted in the municipality of Sumidouro (22° 02' 46" S; 42° 41' 21" W), a rural area of the Atlantic Forest situated in Rio de Janeiro state (Brazil). In this area, *N. squamipes* is the main non-human host of *S. mansoni* (Silva et al., 1992) and its levels of infection do not change even if the human population is treated with anti-schistosome drugs (D'Andrea et al., 2000).

The region has a humid-mesothermic climate; rainfall is seasonal and heaviest between November and March, whereas the dry months generally extend from May to August (D'Andrea et al., 2000). The capture sites were established along watercourses and flooded areas, according to the semi-aquatic habits of *N. squamipes* (D'Andrea et al., 2007). Fecal samples were collected from every trapped rat. To confirm infection, fecal samples were prepared on slides and microscopically examined, using the Kato-Katz smear technique (Katz

et al., 1972). The miracidia obtained from eggs in positive fecal samples from 3 *N. squamipes* (isolate R) were used to infect laboratory-bred *Biomphalaria glabrata* snails.

2.2. Ethical approval

All animal experiments were conducted in accordance with valid international guidelines for animal experimentation (Ellery, 1985) and were in accordance with the ethical rules of the Oswaldo Cruz Foundation Animal Ethics Committee (L-0017/08) and Brazilian Institute of the Environment and Renewable Natural Resources (IBAMA license number 02001.000384/00-12).

2.3. Mice and parasites

Swiss Webster (SW) mice were housed under standard caging conditions: polypropylene boxes (40 × 33 cm) with stainless steel screened covers in a room with controlled temperature ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) and humidity ($60 \pm 10\%$) and artificial dark/light cycle (lights on from 07:00-19:00). The animals had free access to water and food (Nuvilab CR-1, Paraná, Brazil).

2.4. Life-cycle maintenance

Cercariae of *S. mansoni* (isolate R) were obtained from infected *B. glabrata* snails following exposure to artificial light to induce cercariae shedding in our laboratory, while isolate BH was maintained in the Malacology Laboratory (Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil), also using *B. glabrata* snails and SW mice as intermediate hosts, respectively (Paraense and Corrêa, 1981).

The procedures for experimental infections have been described previously (Freire et al., 2003). Briefly, female and male mice (n=28) were subcutaneously infected with 50

cercariae (isolate R), while the control mice (n=25) were exposed to isolate BH, susceptible to praziquantel (Drescher et al., 1993).

2.5. Treatment schedule

The mice were given praziquantel (Merck®) dissolved in 2% cremophor- EL (Sigma, Chemical Company, St. Louis, USA) by gastric gavage at total dosages of 62.5mg/kg, 125mg/kg, 250mg/kg and 500mg/kg) each dose divided over 3 days (49, 50 and 51 days after infection) (Sabah et al.,1986). Infected untreated mice remained as control group.

2.6. Assessment of the therapeutic effects

2.6.1. Worm burden determination

Two weeks after treatment, the mice from both isolates were euthanized using a CO₂ chamber. Adult worms recovered by hepatic and mesenteric perfusion were counted and sexed under a stereomicroscope (Smithers and Terry, 1965). The worm burden (infectivity) was determined as the percentage of maturation of cercariae into adult worms recovered from the portal system and mesenteric veins (Freire et al., 2003). The percentage reduction of worm burden in each drug treated group (Cioli et al., 2004) was calculated according to the following equation:

$$\text{Reduction (\%)} = \frac{\text{no. of worms in control group} - \text{no. of worms in treated group}}{\text{no. of worms in control group}} \times 100$$

2.6.2. Parasitological studies

Stool pellets were collected weekly from the mice at 6 weeks until euthanasia and microscopically examined to confirm the establishment of infection and fecal egg dynamics. Eggs per gram of feces (epg) were determined in individual samples/animal/day, using the Kato-Katz thick smear technique (Katz et al.,1972).

2.6.3 Egg developmental stages (oogram pattern)

The whole small intestine was removed from every mouse, opened lengthwise and separated into two equal sections (proximal and distal). A sample (1cm long) from the last section was taken and crushed between two glass slides to obtain a thin preparation (Machado-Silva et al., 1991). The percentage of eggs at various developmental stages (immature, mature and dead) was determined by light microscopy (Pellegrino et al., 1962).

2.7. Statistical analysis

Data analysis was performed using the Graph Pad InStat statistical program. Biological data were analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). Measurements with p -values ≤ 0.05 were considered significantly different.

3. Results

3.1. Fecal egg release

The kinetics of fecal egg output indicated that both treated isolates had similar behavior (Figure 1). Eggs were first detected in the feces at week 6, with mean numbers peaking at week 7 and declining thereafter, which was coincident with drug administration. There was a dose-dependent decrease in fecal egg count. Praziquantel was significantly ($p = 0.003$) effective against isolate R at a dose of 500mg/kg, at which egg excretion reached zero by the end of the study. With respect to isolate BH, all dosages terminated fecal egg output. Egg-laying from the corresponding untreated controls was significantly higher ($p < 0.001$) than from the treated group.

3.2. Worm burden reduction

Table I shows the worm burden reduction and oogram pattern in relation to the dosage of praziquantel administered to the infected mice. Untreated control mice infected with isolate R yielded higher mean number (31 ± 4 ; 62%) than BH (25 ± 3 ; 50%). The data on

worm burden reduction revealed that treatment efficacy was dose-dependent. At low doses of 62.5mg/kg, the mean worm burden reduction and percentage were lower for both isolate R (25 ± 4 ; 19%) and isolate BH (17 ± 5 ; 32%). When 125mg/kg was administered, the efficacy against isolate R increased (23 ± 5 ; 26%), as it did against isolate BH (11 ± 2 ; 56%). The treatment efficacy was significantly higher ($p < 0.05$) at the two highest praziquantel concentrations tested: 250mg/kg (9 ± 3 ; 71% and 6 ± 2 ; 76%) and 500mg/kg (4 ± 1 ; 87% and 1 ± 1 ; 96%), for isolate R and BH, respectively.

It should be noted that treatment caused a dose-dependent reduction in the sex ratio only in isolate R. The male/female ratio decreased from 4:1 (untreated group) to 1:1 (group 4) (Table I).

3.3. Egg developmental stages

In the oogram assay, both treated and untreated mice presented eggs at all stages of development, although therapeutic efficacy was dependent on the treatment schedule. At the lowest dose (62.5mg/kg) of PZQ, the percentage of immature eggs was 17% (isolate R) and 38% (isolate BH). At the next higher dose (125mg/kg), isolate R showed a slight increasing in the percentage of immature eggs (20%), whereas the rate for isolate BH declined from 38% to 16%. When 250mg/kg was given, immature eggs dropped significantly to 1% (isolate R) and 4% (isolate BH). At the highest dose tested (500mg/Kg), no immature eggs were found in isolate R, whereas in BH the rate was 8%.

As shown in Table 1, the percentage of mature eggs was less than in the corresponding untreated control at 125 mg/kg, 250mg/kg and 500mg/kg (isolate R). In regard to isolate BH, this percentage occurred only at the lowest dosage. There was a sharp increase in the percentages of dead eggs in all treated groups, with significant ($p < 0.0001$) increases to 62% and 64% in groups 3 and 4, respectively (isolate R). The percentage of dead eggs rose

from 34% (group 1) to 58% (group 3) in isolate BH. Although group 4 showed lowest increase in the percentage of dead eggs, to 46%, it was significantly higher ($p < 0.05$) compared to the 8% in the control group (Table 1).

There was no correlation between the number of worms recovered and the oogram pattern or fecal egg output.

4. Discussion

PZQ has become the drug of choice for schistosomiasis due to its effective pharmacological properties, lack of toxicity and relatively low cost (for a review, see Doenhoff et al., 2008). To our knowledge, this is the first study of the effects of PZQ against a naturally occurring Brazilian rodent isolate of *S. mansoni*. Such investigation is important because Sigmondontinae rodents act as reservoirs of *S. mansoni*, which hampers schistosomiasis control programs (Rey, 1993; Peralta et al., 2009). Another contribution of this study is that the isolate used is derived from a region where there is a positive correlation between the prevalence of infection in the rodent and human populations (D'Andrea et al., 2000).

Obtaining an isolate from wild rodents in laboratory mice was the first step for further testing of its susceptibility to schistosomicides. It is interesting that the isolate derived from *N. squamipes* was adapted to SW mice based on the kinetics of fecal egg-output and perfusion data, which revealed maturation between 56 and 60% at 8 weeks in the C3H/He mouse strain (Freire et al., 2003).

The gold standard for diagnosing schistosomiasis infection is microscopic detection of eggs from stools. Moreover, changes in patterns of schistosome egg excretion are mostly used to determine the drug's effectiveness, in terms of a cure rate and/or egg reduction rate (Doenhoff et al., 2008). Analysis of fecal samples may not reveal eggs due to a number of

factors, including the level of infection, which influences the sensitivity limits of the examination technique (Berhe et al., 2004; Gonçalves et al., 2006). In this study, aiming to improve the limitation of diagnosis, multiple fecal examinations were performed (Wilson et al., 2006)

The examination of fecal material using the Kato-Katz thick smear technique demonstrated an initial rise in the egg-output by week 6-7, which declined after the mice were given PZQ. These results are consistent with reports from other therapeutic assays (Lescano et al., 2004).

Under laboratory conditions, this efficacy against mature infection can also be assessed by worm burden reduction and oogram changes (Pellegrino et al., 1977; Botros et al., 2004; Araújo et al., 2008). It is worth mentioning that all dosages used here are included as PZQ subcurative doses, while 600mg/kg is a curative one (Chaiworaporn et al., 2005). The praziquantel dosage protocols in the present study caused a significant worm burden reduction and modifications in the oogram pattern, with the best efficacy attained with the highest dose (500mg/kg).

PZQ was more effective against isolate BH than isolate R. Isolate BH has been found to be sensitive to PZQ (Drescher et al., 1993). Moreover, differences in susceptibility to PZQ have also been reported among isolates of different geographic origin (Fallon et al., 1997) and between long-maintained laboratory isolates and those from natural human infections (Melman et al., 2009). A major consideration for such difference is that field isolates from Brazil are more diverse than long-maintained laboratory isolates (Rodrigues et al., 2002). One potential explanation is that field isolates decrease variability due to loss of alleles after passage in murine hosts (Loverde et al., 1985). The genetic bottleneck may be the reason for such findings (Bech et al., 2010). The time lapse for each isolate that has been maintained

under laboratory conditions is probably the underlying reason for such differences between isolates.

Our *in vivo* study showed a higher sensitivity of male worms from isolate R, inferred from the sex- ratio data, which were male-biased (4:1, untreated group) and decreased to a 1:1 male/female ratio in mice exposed to a higher dosage (500mg/kg). Our finding support previous observations (Gonnert and Andrews, 1977), but other studies have shown preferential killing of female worms by PZQ (Delgado et al., 1992).

Examination of the oograms showed a lower percentage of immature and mature eggs and a higher percentage of dead eggs than in the control animals. Nevertheless, there are no doubts about the effects of PZQ on adult worms (Doenhoff et al., 2008). The effect of a double dose of PZQ on mature eggs has been reported (Giboda and Smith, 1994). This is an important issue because only mature eggs can cross gut tissue to be excreted with the host's feces (Giboda and Smith, 1994). The possible explanation is that high doses of PZQ could be acting on the reproductive system of female worms. In this situation, eggs could display low development capacity or the dosages used here were enough to act on the mature eggs, as previously reported (Giboda and Smith, 1994). This impairment could lead to the death of the embryo within the egg. Morphological studies to assess changes in the reproductive system (Shaw and Erasmus, 1988; Neves et al., 2004) of adult worms are ongoing. Interestingly, morphological studies through scanning confocal laser microscopy for determination of egg viability (Holtfreter et al., 2011) and functional criteria such as labeling the eggs with the Hoechst 33258 fluorescent probe (Sarvel et al., 2006) and intestine histopathology (Conceição et al., 2008) can provide important information regarding this issue. Our findings indicate that the wild isolate from *N. squamipes* is susceptible to praziquantel. Although public health officials consider the best schistosomiasis control strategy to be treatment of the infected

human population, the epidemiologic significance of the presence of infected wild water rat hosts needs to be considered.

References

- Alarcón de Noya, B., Pointier, J.P., Colmenares, C., Théron, A., Balzan, C., Cesari, I.M., Gonzales, S., Noya O., 1997. Natural *Schistosoma mansoni* infection in wild rats from Guadeloupe: parasitological and immunological aspects. *Acta Tropica* 68, 11-21.
- Antunes, C.M., Milward-de-Andrade, R., Katz, N., Coelho, P.M., Pellegrino J., 1973 Role of *Nectomys squamipes squamipes* in the epidemiology of *Schistosoma mansoni* infection. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 67, 67-73.
- Araújo, N., Souza, C.P., Passos, L.K., Simpson, A.J., Dias Neto, E., Pereira, T.R., Cerutti Júnior, C., Alencar, F.E., Dietze, R., Katz, N., 1996. Susceptibility to chemotherapeutic agents of *Schistosoma mansoni* isolates from patients treated with oxamniquine and praziquantel and not cured. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 29, 467-76.
- Araújo, N., Mattos, A.C.A., Sarvel, A.K., Coelho, P.M.Z., Katz, N., 2008. Oxamniquine, praziquantel and lovastatin association in the experimental schistosomiasis mansoni. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 103, 450-454.
- Barbosa, F.S., Barbosa, I., Arruda, F., 1962. *Schistosoma mansoni*: Natural infection of cattle in Brazil. *Science* 138, 831.
- Bech, N., Beltran, S., Portela, J., Rognon, A., Alliene, J. F., Boissier, J., Théron, A., 2010. Follow-up of the genetic diversity and snail infectivity of a *Schistosoma mansoni* strain from field to laboratory. *Infection, Genetics and Evolution* 10, 1039-1045.
- Berhe, N., Medhin, G., Erko, B., Smith, T., Gedamu, S., Bereded, d., Moore, R., Habte, E., Redda, A., Gebre-Michael, T., Gundersen S.G., 2004. Variations in helminth faecal egg

- counts in Kato-Katz thick smears and their implications in assessing infection status with *Schistosoma mansoni*. *Acta Tropica* 92, 205-212.
- Bonvicino, C.R., Lindbergh, S.M., Maroja, L.S., 2002. Small non-flying mammals from conserved and altered areas of Atlantic forest and Cerrado: comments on their potential use for monitoring environment. *Brazilian Journal of Biology* 62, 765-774.
- Botros, S., William, S., Ebeid, F., Cioli, D., Katz, N., Day, T.A., Bennett, J.L., 2004. Lack of evidence for an antischistosomal activity of myrrh in experimental animals. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 71, 206-210.
- Chaiworaporn, R.C., Maneerat, Y., Rojekittikhun, W., Ramasoota, P., Janecharut, T., Matsuda, H., Kitikoon, V., 2005. Therapeutic effect of subcurative dose praziquantel on *Schistosoma mansoni* infected mice and resistance to challenge infection after treatment. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 36, 846-852.
- Chen, M.G., 2005. Use of praziquantel for clinical treatment and morbidity control of schistosomiasis japonica in China: a review of 30 years' experience. *Acta Tropica* 96, 168-176.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A., Savioli, L., 2000. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* 77, 41-51.
- Cioli, D., Botros, S.S., Francklow, K.W., Mbaye, A., Southgate, V., Tchuenté L.A., Pica-Mattoccia, L., Troiani, A.R., El-Din, S.H., Sabra, A.N., Albin, J., Engels, D., Doenhoff, M.F., 2004. Determination of ED₅₀ values for praziquantel in praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *International Journal for Parasitology* 34, 979-987.

- Conceição, M.J., Lenzi, H.L., Coura, J.R., 2008. Human study and experimental behavior of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with different clinical forms of schistosomiasis. *Acta Tropica* 108, 98-103
- D'Andrea, P.S., Maroja, L.S., Gentile, R., Cerqueira, R., Maldonado Júnior, A., Rey, L., 2000. The parasitism of *Schistosoma mansoni* (Digenea:Trematoda) in a naturally infected population of water rats, *Nectomys squamipes* (Rodentia:Sigmondontinae) in Brazil. *Parasitology* 120, 573-582.
- D'Andrea, P.S, Fernandes, F.A., Cerqueira, R., Rey, L., 2002. Experimental evidence and ecological perspectives for the adaptation of *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Digenea: Schistosomatidae) to a wild host, the water-rat, *Nectomys squamipes* Brants, 1827 (Rodentia: Sigmodontinae) in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 97 (1), 11-14.
- D'Andrea, P.S., Gentile, R., Maroja, L.S., Fernandes, F.A., Coura, R., Cerqueira, R., 2007. Small mammal populations of an agroecosystem in the Atlantic Forest domain, southeastern Brazil. *Brazilian Journal of Biology* 67, 179-186.
- Delgado, V.S., Suárez, D.P., Cesari, I.M., Incani, R.N., 1992. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains and on both sexes of the parasite. *Parasitology Research* 78, 648-654.
- Doenhoff, M.J., Cioli, D., Utzinger, J., 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 21, 659-667.

- Doenhoff, M.J., Hagan, P., Cioli, D., Southgate, V., Pica-Mattoccia, L., Botros, S., Coles, G., Tchum Tchuenté, L.A., Mbaye, A., Engels, D., 2009. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology* 136, 1825-1835.
- Drescher, K., Rogers, E.J., Bruce, J.I., Katz, N., Dias, L.C., Coles G.C., 1993. Response of drug resistant isolates of *Schistosoma mansoni* to antischistosomal agents. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88, 89-99.
- Ellery, A.W., 1985. Guidelines for specification of animals and husbandry methods when reporting the results of animal experiments. Working Committee for the Biological Characterization of Laboratory Animals/GV-SOLAS. *Laboratory Animals* 19, 106-108.
- Fallon, P.G., Doenhoff, M.J., 1994. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 51, 83-88.
- Fallon, P.G., Mubarak, J.S., Fookes, R.E., Niang, M., Butterworth, A.E., Sturrock, R. F., Doenhoff, M.J., 1997. *Schistosoma mansoni*: Maturation rate and drug susceptibility of different geographic isolates. *Experimental Parasitology* 86, 29-36.
- Freire, N., Rodrigues-Silva, R., Machado-Silva, J.R., Rey, L., 2003. A comparative parasitologic study on *Biomphalaria glabrata* snail and C3H/He mice infected with human and murine isolates of *Schistosoma mansoni* derived from Sumidouro, Rio de Janeiro, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 783-787.
- Giboda, M., Smith, J.M., 1994. *Schistosoma mansoni* eggs as a target for praziquantel: efficacy of oral application in mice. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 97, 98-102.

- Gonçalves, M.M., Barreto, M.G., Peralta, R.H., Gargioni, C., Gonçalves, T., Igreja, R. P., Soares, M.S., Peralta, J.M., 2006. Immunoassays as an auxiliary tool for the serodiagnosis of *Schistosoma mansoni* infection in individuals with low intensity of egg elimination. *Acta Tropica* 100, 24-30.
- Gonnert, R., Andrews, P., 1977. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Zeitschrift für Parasitenkunde* 52, 129-150.
- Holtfreter, M.C., Stachs, O., Reichard, M., Loebermann, M., Guthoff, R.F., Reisinger, E.C., 2011. Confocal laser scanning microscopy for detection of *Schistosoma mansoni* eggs in the gut of mice. *PLoS ONE* 6, e18799.
- Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J., 1972. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 14, 397-400.
- Lescano, S.Z., Chieffi, P.P., Canhassi, R.R., Boulos, M., Amato Neto, V., 2004. Antischistosomal activity of artemether in experimental schistosomiasis mansoni. *Revista de Saúde Pública* 38, 71-75.
- LoVerde, P.T., DeWald, J., Minchella, D.J., Bosshardt, S.C., Damian, R.T., 1985. Evidence for host-induced selection in *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology* 71, 297-301.
- Machado-Silva, J.R., Oliveira, R.M.F., Rodrigues-Silva, R., Maldonado Jr., A., Rey, L., 1991. Roedores silvestres como modelos experimentais da esquistossomose mansônica: *Akodon arviculoides* (Rodentia: Cricetidae). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 33, 257-261.

- Maldonado Jr., A., Machado-Silva, J.R., Rodrigues-Silva, R., Lenzi H.L., Rey, L., 1994. Evaluation of the resistance to *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes* (Rodentia:Cricetidae), a natural host of infection in Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 36 (3), 193-198.
- Martinez, E.M., Costa-Silva, M., Neves, R.H., Oliveira, R.M., Machado-Silva J.R., 2008. Biological implications of the phenotypic plasticity in the *Schistosoma mansoni*-*Nectomys squamipes* model. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 50, 229-232.
- Melman, S.D., Steinauer, M.L., Cunningham, C., Kubatko, L.S., Mwangi, I.N., Wynn, N.B., Mutuku, M.W., Karanja, D.M., Colley, D.G., Black, C.L., Secor, W.E., Mkoji, G.M., Loker, E.S., 2009. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 3 (8), e504.
- Modena, C.M., Lima, W.S., Coelho, P.M., 2008. Wild and domesticated animals as reservoirs of schistosomiasis mansoni in Brazil. *Acta Tropica* 108, 242-244.
- Moreira, L.S., Piló-Veloso, D., Mello, R.T., Coelho, P.M., Nelson D.L., 2007. A study of the activity of 2-(alkylamino)-1-phenyl-1-ethanethiosulfuric acids against infection by *Schistosoma mansoni* in a murine model. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 101, 385-390.
- Nelson, G.S., 1960. Schistosome infections as zoonoses in Africa. *Transactions of Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 54, 301-24.
- Neves, R.H., Costa-Silva, M., Martinez, E.M., Branquinho, T.B., Oliveira, R.M., Lenzi, H.L., Gomes, D.C., Machado-Silva, J.R., 2004. Phenotypic plasticity in adult worms of *Schistosoma mansoni* (Trematoda:Schistosomatidae) evidenced by brightfield and confocal laser scanning microscopies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 99, 131-136.

- Paraense, W.L., Corrêa, L.R., 1981. Observations on two biological races of *Schistosoma mansoni*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 76, 287-291
- Pellegrino J., Oliveira C.A., Faria J., Cunha A.S., 1962. New approach to screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 11, 201-215.
- Pellegrino, J., Lima-Costa, F.F., Carlos, M.A., Mello, R.T., 1977. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. XIII. Activity of praziquantel, an isoquinoline-pyrazino derivative, on mice, hamsters and *Cebus* monkeys. Zeitschrift fur Parasitenkunde 52, 151-168.
- Peralta, R.H.S., Melo, D.S., Gonçalves, M.M., D'Andrea, P.S., Rey, L., Machado-Silva, J.R., Peralta, J.M., 2009. Serological studies in *Nectomys squamipes* demonstrate the low sensitivity of coprological exams for the diagnosis of schistosomiasis. The Journal of Parasitology 95, 764-766.
- Rey, L., 1993. Non-human vertebrate hosts of *Schistosoma mansoni* and schistosomiasis transmission in Brazil. Research and Reviews in Parasitology 53, 13-25.
- Rodrigues, N.B., Coura Filho, P., Souza, C.P., Jannoti Passos, L.K., Dias-Neto E., Romanha, A.J., 2002. Populational structure of *Schistosoma mansoni* assessed by DNA microsatellites. International Journal for Parasitology 32, 843-851.
- Sabah, A.A., Fletcher, C., Webbe, G., Doenhoff, M.J., 1986. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infection of different ages. Experimental Parasitology 61, 294-303.
- Sarvel, A.K., Kusel, J.R., Araujo, N., Coelho, P.M.Z., Katz, N., 2006. Comparison between morphological and staining characteristics of live and dead eggs of *Schistosoma mansoni*. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 101 (1), 289-292.

- Sarvel, A.K., Oliveira, A.A., Silva, A.R., Lima, A.C.L., Katz, N., 2011. Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. PLoS Neglected Tropical Diseases. 5 (3), e990
- Shaw, M.K., Erasmus, D.A., 1988. *Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced changes to the female reproductive system. Experimental Parasitology 65, 31-42
- Silva, R.R., Machado-Silva, J.R., Freire, N.F., Lenzi, H.L., Rey, L., 1992. Natural infection of wild rodents by *Schistosoma mansoni*. Parasitological aspects. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 87, 271-276.
- Smithers, S.R., Terry, R.J., 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. Parasitology 55, 695-700.
- Souza, V.A., Rodrigues-Silva, R., Maldonado Jr., A., Machado-Silva, J.R., Rey, L., 1992. *Nectomys squamipes* (Rodentia: Cricetidae) as an experimental model for schistosomiasis mansoni. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 87, 277-280.
- Standley, C.J., Mugisha, L., Verweij, J.J., Adriko, M., Arinaitwe, M., Rowell, C., Atuhaire, A., Betson, M., Hobbs, E., van Tulleken, C.R., Kane, R.A., van Lieshout, L., Ajarova, L., Kabatereine, N.B., Russell Stothard, R.J., 2011. Confirmed infection with intestinal schistosomiasis in semi-captive wild-born chimpanzees on Ngamba Island, Uganda. Vector Borne and Zoonotic Diseases 11, 169-176.
- Théron, A., Pointier, J.P., Morand, S., Imbert-Establet, D., Borel, G., 1992. Long-term dynamics of natural populations of *Schistosoma mansoni* among *Rattus rattus* in patchy environment. Parasitology 104, 291-298.
- Wilson, R.A., van Dam, G., Kariuki T.M., Farah, I.O., Deelder, A.M., Coulson, P.S., 2006. The detection limits for estimates of infection intensity in schistosomiasis mansoni

established by a study in non-human primates. *International Journal for Parasitology* 36, 1241-1244.

WHO., 1993. The control of schistosomiasis. Second report of the WHO Expert Committee.

World Health Organization Technical Report Series. 830, 1-86

Acknowledgments

We gratefully acknowledge financial support from the National Council for Scientific and Technological Development - CNPq and the State of Rio de Janeiro Carlos Chagas Filho Research Foundation - FAPERJ. We also express our appreciation to Dr. Lygia Reis Corrêa of the Laboratory of Malacology at Oswaldo Cruz Institute for providing the cercariae, and to the staff of the Laboratory of Biology and Parasitology of Wild Reservoir Mammals - FIOCRUZ, particularly André Campos Santana for technical assistance.

Conflicts of interest statement

The authors have no conflicts of interest concerning the work reported in this paper.

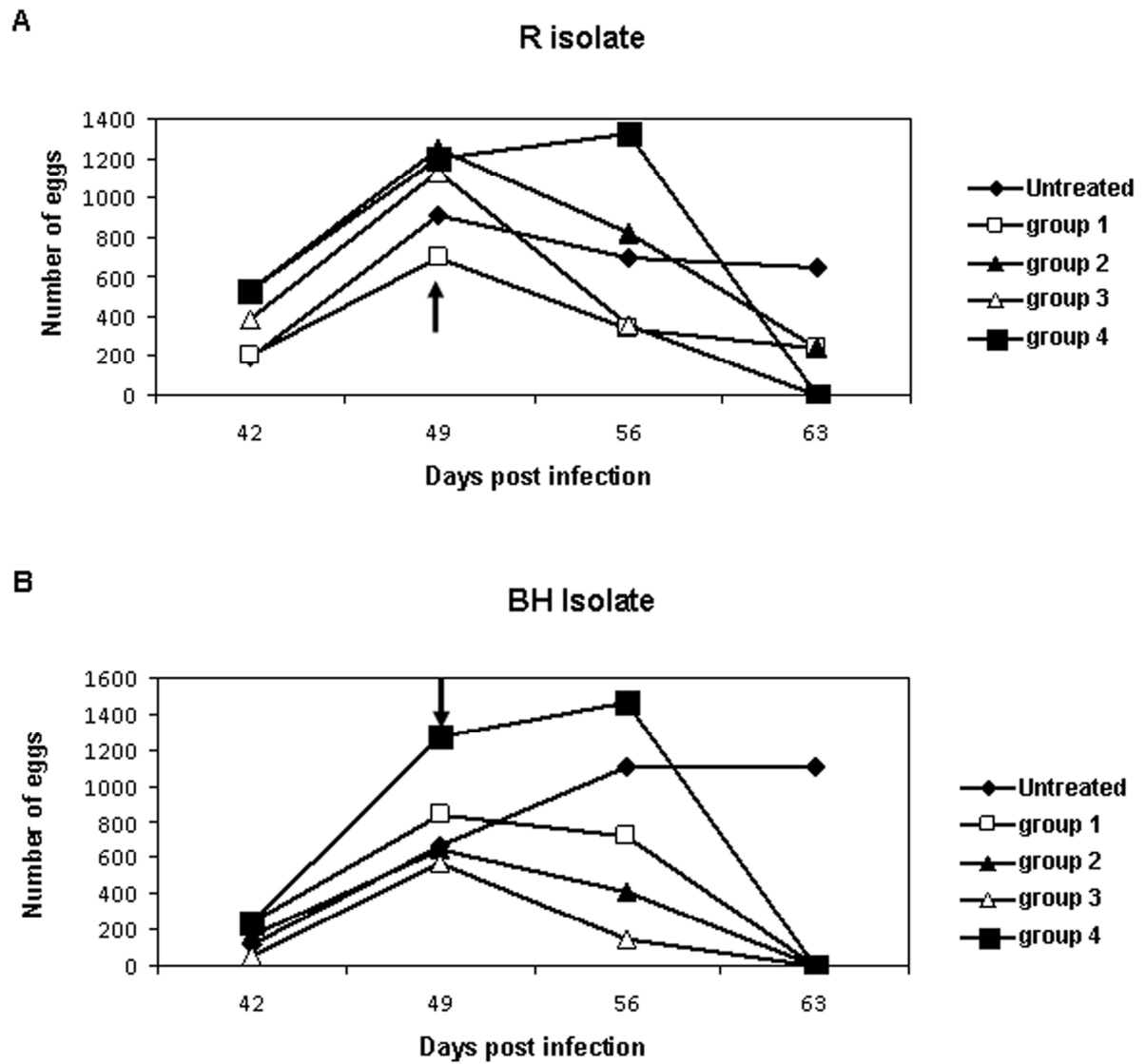


Figure 1: Kinetics of egg excretion in stool after treatment with praziquantel (PZQ) administered at different dosages to Swiss Webster mice infected with (A) rodent (R) or (B) Belo Horizonte (BH) isolates of *Schistosoma mansoni*. A and B.

Table A.1: Parasitological effects of different dosages of praziquantel against isolates (R and BH) of *Schistosoma mansoni* harbored in mice.

Parameters	Groups									
	R isolate					BH isolate				
	Untreated	1	2	3	4	Untreated	1	2	3	4
Worm recovery	31 ± 4	25 ± 4	23 ± 5	9 ± 3*	4 ± 1*	25 ± 3	17 ± 5	11 ± 2*	6 ± 2*	1 ± 1*
Male-female ratio	4:1	3:1	2:1	3:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1	1:1
Worm reduction (%)	-----	19	26	71*	87*	-----	32	56*	76*	96*
Oogram										
Immature	32 ± 6	17 ± 2	20 ± 6	1 ± 0.5*	0*	39 ± 4	38 ± 15	16 ± 6	4 ± 2*	8 ± 4
Mature	47 ± 5	48 ± 4 [#]	38 ± 6	37 ± 7	36 ± 1	53 ± 4	28 ± 5 [#]	47 ± 2	38 ± 13	46 ± 7
Dead	21 ± 2 [#]	35 ± 3	42 ± 6*	62 ± 7*	64 ± 1 ^{*#}	8 ± 1 [#]	34 ± 11	37 ± 4	58 ± 13*	46 ± 6 ^{*#}

Groups: 1 (62.5mg/kg), 2 (125mg/kg), 3 (250mg/kg), 4 (500mg/kg).

Oogram (%): Egg developmental stages.

* Significant difference (p< 0.05) when compared with the respective untreated group.

[#] Significant difference (p< 0.05) when compared between each dosage regarding BH and R isolate.

----- (data not analysed)