

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**ASSOCIAÇÃO DE TESTOSTERONA E PRAZIQUANTEL NO TRATAMENTO
DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL**

FERNANDA ANDRADE DE CÉSAR

RECIFE

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ASSOCIAÇÃO DE TESTOSTERONA E PRAZIQUANTEL NO TRATAMENTO
DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL

FERNANDA ANDRADE DE CÉSAR

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas como parte dos requisitos para a
obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas.**

Orientadora:
Prof^a Dr^a Suely Lins Galdino

Co-orientadoras:
Prof^a Dr^a Maria Inês Wanderley
Prof^a Dr^a Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

RECIFE

2008

César, Fernanda Andrade

Associação de testosterona e praziquantel no tratamento da esquistossomose mansone experimental./ Fernanda Andrade de César. – Recife: A Autora, 2008.

104 fls. .: il.

Dissertação (Mestrado: Ciências Biológicas) – UFPE. CCB

1. Esquistossomose 2. Praziquantel 3. Testosterona

I.Título

616.963

CDU (2ª. Ed.)

UFPE

616.963

CDD (22ª. Ed.)

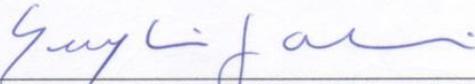
CCB – 2008 – 17

FERNANDA ANDRADE DE CÉSAR

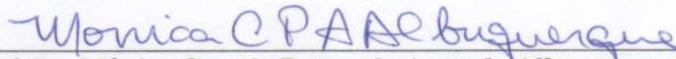
**ASSOCIAÇÃO DE TESTOSTERONA E PRAZIQUANTEL NO TRATAMENTO
DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL**

Dissertação apresentada em 21 de Fevereiro de 2008 à Banca Examinadora:

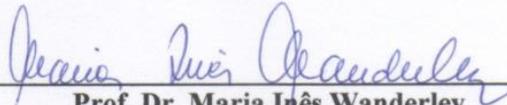
EXAMINADORES



Prof. Dr. Suely Lins Galdino (Orientador)
Departamento de Antibióticos - UFPE

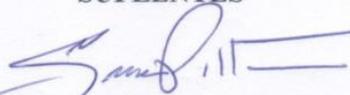


Prof. Dr. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
Departamento de Medicina Tropical - UFPE

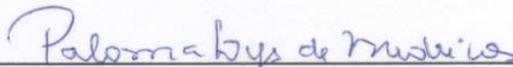


Prof. Dr. Maria Inês Wanderley
Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFPE

SUPLENTES



Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta
Departamento de Antibióticos - UFPE



Prof. Dr. Paloma Lys de Medeiros
Departamento de Histologia e Embriologia - UFPE

RECIFE, 2008

Onde você vê um obstáculo,
alguém vê o término da viagem
e o outro vê uma chance de crescer.

Onde você vê um motivo pra se irritar,
Alguém vê a tragédia total
E o outro vê uma prova para sua paciência.

Onde você vê a morte,
Alguém vê o fim
E o outro vê o começo de uma nova etapa...

Onde você vê a fortuna,
Alguém vê a riqueza material
E o outro pode encontrar por trás de tudo, a dor e a miséria total.

Onde você vê a teimosia,
Alguém vê a ignorância,
Um outro compreende as limitações do companheiro,
percebendo que cada qual caminha em seu próprio passo.

E que é inútil querer apressar o passo do outro,
a não ser que ele deseje isso.
Cada qual vê o que quer, pode ou consegue enxergar.

"Porque eu sou do tamanho do que vejo.
E não do tamanho da minha altura."

Fernando Pessoa

Dedico a

Meus pais
Fernando Antonio de César
Maria do Céu Andrade de César

Meus avós
Cezar e Eliete (*in memoriam*)
Valdir (*in memoriam*) e Gilda

E minha bisavó
Francisca Ferreira (*in memoriam*)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a oportunidade de vida, como também, a força e a coragem para trilhar este longo caminho.

A meus pais, familiares e namorado, pelo amor, dedicação, educação e caráter. Tudo o que sou devo a vocês.

A Prof. Dr. Suely Lins Galdino, por ter me aceito como orientanda, sem nenhum conhecimento prévio, e ter batalhado por este projeto junto a mim e todos os colaboradores.

A Prof. Dr. Maria Inês Wanderley, por ter dividido o seu projeto comigo, e todo o seu conhecimento de fisiologia.

A Prof. Dr. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque, por ter visto potencial em mim, e ter sido uma professora inesquecível. Tudo o que sei hoje devo a você, e todas as minhas realizações são frutos desse trabalho de cinco anos.

A Prof. Dr. Maria do Carmo Lima e ao Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta, pela colaboração, e orientação na parte química do projeto. E por fazer parte do Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica.

A todos os professores da Disciplina de Parasitologia/Departamento de Medicina Tropical, UFPE, pelo enorme aprendizado, desde o período de monitoria na graduação.

A todos os professores e amigos feitos no Setor de Imunologia do LIKA que sempre estiveram disponíveis para ajudar-me, e ensinaram muito de suas experiências laboratoriais.

Aos meus grandes amigos, que sempre estiveram presentes, em cada passo desta longa caminhada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela oportunidade de Mestrado.

A UFPE, pela concessão de Bolsa de Estudos.

A todos que não foram citados, mas foram essenciais à realização desta dissertação de mestrado.

E, novamente, a todos, que continuarão participando de todos os projetos da minha vida...

SUMÁRIO

Agradecimentos	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Abreviaturas	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução	16
2. Objetivos	18
3. Revisão de Literatura	19
3.1. Esquistossomose Mansoní	19
3.1.1. Distribuição Geográfica e Epidemiologia	20
3.1.2. Morfologia	23
3.1.3. Ciclo Biológico	25
3.1.4. Manifestações Clínicas	26
3.1.5. Imunopatologia da Esquistossomose Mansoní	28
3.1.6. Diagnóstico	29
3.2. Tratamento da Esquistossomose Mansoní	31
3.3. Testosterona	34
3.2.1. Biossíntese	34
3.2.2. Funções dos Andrógenos	37
3.2.3. Diferenças Imunológicas entre os Sexos	38
3.4. Modulação da Esquistossomose pela Testosterona	42
4. Animais, Material e Métodos	46
4.1. Animais	46
4.1.1. Camundongos	46
4.1.2. Caramujos	46
4.1.3. <i>Schistosoma mansoni</i>	46
4.2. Material	46
4.2.1. Praziquantel	46
4.2.2. Testosterona	46
4.3. Metodologia	47
4.3.1. Infecção de Caramujos do Gênero <i>Biomphalaria glabrata</i> com miracídio	

de <i>Schistosoma mansoni</i>	47
4.3.2. Infecção de Camundongos <i>Mus musculus</i> com cercárias de <i>Schistosoma mansoni</i>	47
4.3.3. Tratamento	47
4.3.4. Contagem de Ovos	48
4.3.5. Contagem de Carga Parasitária	49
4.3.6. Viabilidade de Ovos	49
4.3.7. Histopatologia	49
4.3.8. Análise dos Dados	50
4.3. Considerações Éticas	50
5. Resultados e Discussão	51
6. Referências Bibliográficas	64
7. Artigo Científico	81
8. Conclusões Gerais	101
ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1:	Distribuição Mundial da Esquistossomose	21
FIGURA 2:	Distribuição da Esquistossomose Mansonii no Brasil	22
FIGURA 3:	Prevalência de Esquistossomose Mansonii em Pernambuco	23
FIGURA 4:	Formas evolutivas de <i>S. mansoni</i>	25
FIGURA 5:	Ciclo Biológico do <i>Schistosoma</i>	27
FIGURA 6:	Praziquantel	31
FIGURA 7:	Testosterona	34
FIGURA 8:	Vias de Síntese dos Andrógenos	36
FIGURA 9:	Padrão de secreção de gonadotropinas ao longo da vida	38
FIGURA 10:	Oograma de camundongos eutanasiados após 15 dias do término do tratamento com Praziquantel (250 ou 83mg/kg) e/ou Testosterona (350µg/camundongo)	52
FIGURA 11:	Média do número de ovos por grama de fezes de camundongos, nos grupos controle e tratados com Praziquantel (250 ou 83mg/kg) e/ou Testosterona (350µg/camundongo)	52
FIGURA 12:	Redução da carga parasitária após tratamento com Testosterona (700µg/camundongo) e/ou PZQ (250mg/kg)	54
FIGURA 13:	Oograma de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> , e tratados com Testosterona (700µg/camundongo) e/ou PZQ (250mg/kg)	55
FIGURA 14:	Média do número de ovos por grama de fezes de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> e tratados com Testosterona (700µg/camundongo) e/ou PZQ (250mg/kg)	56
FIGURA 15:	Fotomicrografias de granulomas esquistossomóticos em camundongos controle	57
FIGURA 16:	Fotomicrografias de granulomas esquistossomóticos em camundongos tratados com testosterona - 350µg/camundongo (T)	57
FIGURA 17:	Fotomicrografias de fígado e intestino de camundongos tratados com praziquantel - 250 e 83µg/kg (PZQ 1 e PZQ 2)	58
FIGURA 18:	Fotomicrografias de fígado e intestino de camundongos tratados com praziquantel (250 ou 83µg/kg) e testosterona (350µg/camundongo) (PZQ 1 + T e PZQ 2 + T)	59

FIGURA 19:	Fotomicrografias de granulomas esquistossomóticos em camundongos controle	60
FIGURA 20:	Fotomicrografias de granulomas esquistossomóticos em camundongos tratados com testosterona – 700µg/camundongo (TM)	60
FIGURA 21:	Fotomicrografias de fígado e intestino de camundongos tratados com praziquantel - 250 mg/kg (PZQ 3)	61
FIGURA 22:	Fotomicrografias de fígado e intestino de camundongos tratados com praziquantel - 250 mg/kg e testosterona - 350µg/camundongo (PZQ 3 + TM)	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1:	Características morfológicas, malacológicas, clínicas e epidemiológicas de schistosomas de interesse médico	20
TABELA 2:	Efeitos dos esteróides sexuais na resposta imune	41
TABELA 3:	Diferenças imunológicas entre os sexos em resposta à infecção por <i>Schistosoma</i>	44
TABELA 4:	Distribuição dos grupos experimentais de camundongos, de acordo com dose de praziquantel e testosterona	48
TABELA 5:	Atividade esquistossomicida de testosterona (350µg/camundongo) e/ou praziquantel (250 ou 83µg/kg)	51
TABELA 6:	Atividade esquistossomicida de Testosterona (700µg/camundongo) e/ou PZQ (250mg/kg)	53

LISTA DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida, do inglês Acquired Immunodeficiency Syndrome
Ag-Ac	Antígeno- Anticorpo
APC	Células apresentadoras de antígenos, do inglês Antigen-presenting cell
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
Cepa BH	Cepa oriunda de Belo Horizonte
DHEA	Dehydroepiandrosterone
DHEAS	Dehydroepiandrosterone Sulfate
DHT	dihydrotestosterone
FSH	Hormônio Folículo-Estimulante, do inglês Follicle-Stimulating Hormone
FUNASA	Fundação Nacional de Saúde
GnRH	Hormônio Liberador de Gonadotrofinas, do inglês Gonadotropin-releasing Hormone
HDL	Lipoproteína de alta densidade, do inglês High Density Lipoprotein
HE	Técnica de Coloração Histopatológica com Hematoxilina & Eosina
HPA	Eixo Hipotálamo-Hipofisário-Adrenal, do inglês Hypothalamic-pituitary-adrenal Axis
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-10	Interleucina 10
IL-11	Interleucina 11
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
INF γ	Interferon γ
iNOS	Óxido Nítrico Sintetaze Indutível
Ig-A	Imunoglobulina A
Ig-G	Imunoglobulina G

LDL	Lipoproteína de baixa densidade, do inglês Low Density Lipoproteins
LH	Hormônio Luteinizante, do inglês Luteinizing Hormone
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
MΦ	Macrófago
MHC II	Complexo de Histocompatibilidade Principal de Classe II, do inglês Major Histocompatibility Complex Class II
mRNA	Ácido Ribonucléico mensageiro, do inglês Messenger Ribonucleic Acid
NF-κB	Fator Nuclear κB, do inglês Nuclear Factor κB
NK	Células Natural Killers, do inglês Cells Natural Killers
NO	Óxido Nítrico, do inglês Nitric Oxide
PBMC	Células Mononucleadas de Sangue Periférico, do inglês Peripheral Blood Mononuclear Cell
PZQ	Praziquantel
TGF β	Fator de crescimento transformador β, do inglês Transforming Growth Factor β
Th1	Células T Auxiliar tipo 1, do inglês Cells T helper 1
Th2	Células T Auxiliar tipo 2, do inglês Cells T helper 2
TM	Técnica de Coloração Histopatológica com Tricrômico de Masson
TNF α	Fator de Necrose Tumoral α, do inglês Tumor Necrosis Factor
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
WHO	World Health Organization

RESUMO

Os hormônios sexuais, em especial a testosterona, são implicados como um dos fatores que controlam o estabelecimento e patogênese da esquistossomose, seja modulando a resposta imune protetora, ou regulando a infecção por *Schistosoma*, afetando a maturação e oviposição do parasita. Além disso, o praziquantel (PZQ) fármaco de escolha para esquistossomose, tem pouca eficácia contra as formas imaturas do parasito, havendo excelentes resultados quando associado à esteróides. Este estudo tem como objetivo avaliar a associação de testosterona e praziquantel no tratamento da esquistossomose mansoni experimental. Camundongos infectados com *S. mansoni* (cepa BH) foram divididos em grupos tratados com PZQ, PZQ+testosterona, testosterona, e grupo controle infectado. A testosterona foi administrada nas doses 350 e 700µg/camundongo, por via intraperitoneal, duas vezes por semana, começando 10 dias antes da infecção até 1 semana antes da eutanásia. O PZQ foi administrado nas doses 250 e 83mg/kg, que correspondem a 50 e 16% da dose efetiva respectivamente, por via oral, durante três dias consecutivos após 50 dias de infecção. A avaliação foi feita quanto à carga parasitária, produção e viabilidade dos ovos, e alterações histopatológicas. O tratamento com testosterona na dose 350µg/camundongo foi ineficaz em reduzir a carga parasitária, porém sua associação com PZQ (250mg/kg) reduziu em 93,65%, um aumento de 13% na eficácia do último (80,3%). Na dose de 700µg/camundongo, a testosterona sozinha reduziu o número de vermes em 25,90%, o PZQ (250mg/kg) em 73,05%, e a associação de ambos em 95,80%, quando comparados ao controle não tratado. O tratamento dos camundongos apenas com a testosterona aumentou o número de ovos inviáveis em relação ao controle infectado. A associação de PZQ e testosterona induziu uma maior redução no número de ovos nas fezes. O tratamento com PZQ promoveu uma maior preservação dos tecidos hepático e intestinal, não havendo uma potenciação desse efeito protetor pela testosterona. Os resultados sugerem que a testosterona apresenta um efeito benéfico no tratamento da esquistossomose mansoni, aumentando a eficácia do praziquantel.

Palavras-chave: esquistossomose; praziquantel; testosterona

ABSTRACT

Sexual hormones, especially testosterone, are some of the factors that can control the establishment and pathogenesis of schistosomiasis, either modulating the protective immune response, or regulating the infection for *Schistosoma*, affecting the maturation and oviposition of the parasite. Moreover, praziquantel (PZQ) drug of choice for schistosomiasis, has little effectiveness against the immature worms, and the use of steroids simultaneously with schistosomicides has given excellent results. This work aims to evaluate association of testosterone and praziquantel in the treatment of experimental schistosomiasis mansoni. Mice were infected with *Schistosoma mansoni* (strain BH) and divided in groups treated with PZQ, PZQ+testosterone, testosterone, and group untreated control. Mice in the testosterone-treated groups received intraperitoneal injections of 350 and 700 μ g, twice a week beginning 1 week prior to infection and continuing until the mice were sacrificed. PZQ was given orally (250 and 83mg/kg body weight), for five days consecutives after 50 days of infection. Worm burden, production and viability of eggs, and histopathological alterations had been the parameters for evaluation. Testosterone (350 μ g/mouse) was ineffective in reduce the worms burden, but the association with PZQ (250mg/kg) reduced 93,65%, an increase of 13% the effectiveness of this dose (80,3%). Testosterone (700 μ g/mouse) reduced the number of worms in 25,90%, PZQ (250mg/kg) in 73,05% and the association of both in 95,80%, when compared with the untreated control. The treatment of the mice with testosterone alone increased the inviable eggs number in relation to the untreated control. The association of the PZQ and testosterone induced a better in the egg number in faeces. The treatment with PZQ promoted a bigger preservation of hepatic and intestine tissue, there isn't involution of this protective effect for the testosterone. Results suggest that testosterone presents a beneficial effect in the treatment of schistosomiasis mansoni, increasing the effectiveness of praziquantel.

Keywords: schistosomiasis; praziquantel; testosterone

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, que afeta aproximadamente 200 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2006). Estudos epidemiológicos em diferentes regiões endêmicas demonstram que os padrões de infecção por este gênero são similares (FALLON et al., 1998), havendo uma maior prevalência em crianças e homens (KLEIN, 2004).

O pico de infecção para a doença ocorre entre os 10 e 14 anos, seguido por um declínio drástico, o qual se inicia no período da puberdade. Esta importante relação entre idade e sexo, indica que pode haver uma intensa interação entre os sistemas neuroendócrino e imunológico, influenciando o crescimento e reprodução do verme, e dessa forma, as consequências patológicas da infecção (MORALES-MONTOR et al., 2001).

Apesar de os machos serem mais susceptíveis à infecção do que as fêmeas, existem espécies nas quais ocorre o oposto. É o caso de camundongos da espécie *Mus musculus*, onde os machos são mais resistentes à infecção por *Schistosoma mansoni*, e as fêmeas apresentam uma maior resposta pró-inflamatória, desenvolvendo a forma mais grave da doença (ELOI-SANTOS et al., 1992).

A testosterona é um hormônio sexual, cuja presença no hospedeiro pode estar relacionada à menor carga parasitária e à maior longevidade para o mesmo, durante infecção experimental por *S. mansoni*. Estudos experimentais demonstram que, em hamsters e ratos, a esquistossomose está associada a diminuições dos níveis sorológicos de testosterona, e de gonadotropinas (LH e FSH) (LANSOUD-SOUKATE et al., 1991), e em razão deste decréscimo, pode prejudicar a função reprodutora do hospedeiro (KASILIMA et al., 2004). Camundongos machos castrados exibem um nível de infecção semelhante a fêmeas normais, e em contraste, fêmeas tratadas com testosterona exógena têm uma diminuição de carga parasitária comparada a machos intactos (NAKASAWA et al., 1997). A citotoxicidade da testosterona para *S. mansoni* também foi evidenciada em experimentos *in vitro*, e também foi estágio-específica (FANTAPPIÉ et al., 1999), sendo consistente com as observações prévias *in vivo* de Nakasawa e colaboradores (1997). Portanto, uma explicação atribuída para esses resultados é a de que a testosterona pode interagir com o verme de uma forma que interrompa o desenvolvimento do esquistossômulo, o qual é o estágio imaturo do verme, não sendo ativo contra os vermes adultos.

A principal estratégia para o controle da esquistossomose está no tratamento dos indivíduos infectados, o qual consiste na utilização do praziquantel (PZQ). Este é o fármaco

de escolha, por ser efetivo contra todas as espécies de interesse médico do gênero *Schistosoma*, porém sua eficácia é dependente da idade de infecção, pois vermes imaturos são pouco sensíveis à dose padrão do mesmo (PICA-MATTOCCIA e CIOLI, 2004). Além disso, o aparecimento de cepas resistentes ao praziquantel tem preocupado as organizações mundiais de saúde pública. Como exemplo, há uma comunidade no Senegal que apresentou uma baixa média de cura para a dose terapêutica de praziquantel (STELMA et al., 1995).

O fato do praziquantel não apresentar atividade sobre as fases imaturas do *Schistosoma*, tem sérias implicações no tratamento da esquistossomose aguda toxêmica, a qual ainda não tem uma abordagem terapêutica consolidada. Procurando resolver este problema, o uso de esquistossomicidas associados à esteróides tem sido pesquisado experimentalmente em camundongos, com resultados satisfatórios, como os encontrados com glicocorticóides como dexametasona (PYRRHO et al., 2002); cortisona (HARRISON e DOENHOFF, 1983); prednisolona (LAMBERTUCCI et al., 1989); e dehidroepiandrosterona (FALLON et al., 1998).

Em virtude destes fatos e das evidências de que a testosterona possui efeito citotóxico nas formas imaturas do *Schistosoma* (FANTAPPIÉ et al., 1999), é de interesse científico estudar a associação entre testosterona e praziquantel, para avaliar um provável efeito benéfico no tratamento da esquistossomose mansoni, especialmente se esta ação produzir uma redução na dose terapêutica do praziquantel, fármaco recomendado pela Organização Mundial de Saúde.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVOS GERAIS

- Avaliar a associação testosterona e praziquantel no tratamento da esquistossomose mansoni experimental.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a testosterona potencia a eficácia do praziquantel no tratamento da esquistossomose mansoni, quanto à carga parasitária, contagem e viabilidade dos ovos do parasito;
- Analisar as características histopatológicas de tecido hepático e intestinal de animais infectados com *S. mansoni*, e tratados com praziquantel e/ou testosterona.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

A esquistossomose permanece como um grave problema de saúde pública mundial, sendo reconhecida como a segunda doença parasitária mais prevalente, em virtude de sua ampla área endêmica e número de indivíduos infectados. Estima-se que aproximadamente 200 milhões de pessoas estejam infectadas, e outras 600 milhões encontrem-se em situação de risco (CHITSULO et al., 2000).

Sua origem remonta à antiguidade, existindo relatos do encontro de ovos do agente etiológico em múmias egípcias e chinesas de cerca de dois mil anos (RUFFER, 1910). No Egito, o parasito tornou-se conhecido em 1852, com a descrição de Theodor Bilharz, daí a denominação bilharziose usada em alguns países. Quarenta anos mais tarde, Patrick Manson levantou a hipótese da existência de duas espécies de *Schistosoma* parasitas do homem (KATZ e DIAS, 1999).

A espécie existente no Brasil foi descrita, em 1907, pelo inglês Sambon, que a nomeou *Schistosoma mansoni*, em homenagem a Manson. No mesmo ano, o brasileiro Pirajá da Silva estudou uma espécie encontrada na Bahia e a chamou de *Schistosoma americanum*. Devido à pequena quantidade de amostras estudadas, os resultados de Sambon não foram bem aceitos. E, somente com as cuidadosas observações de Pirajá da Silva as incertezas taxonômicas foram suprimidas, porém a denominação da espécie coube a Sambon (KATZ e ALMEIDA, 2003).

O agente etiológico da esquistossomose pertence ao filo plathelminthes e classe trematoda, os quais englobam vermes achatados de simetria bilateral e aspecto alongado, apresentando acentuado dimorfismo sexual. Existem cinco espécies do gênero *Schistosoma* respondendo pelos problemas de saúde pública causados a humanidade: *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. intercalatum* (REY, 2001). Elas diferenciam-se por sua morfologia, forma de diagnóstico, gêneros do hospedeiro intermediário e zonas epidemiológicas (TABELA 1).

O *S. mansoni* é o agente da esquistossomose intestinal, única espécie que acomete as Américas Central e do Sul, além da África e Ásia. No Brasil, a doença também é popularmente conhecida por xistosa, barriga d'água ou mal do caramujo, afetando milhares de pessoas que vivem nas áreas endêmicas do país. As espécies do gênero *Schistosoma* provavelmente chegaram às Américas com o tráfico de escravos africanos e com a imigração

asiática, porém apenas o *S. mansoni* adaptou-se a região, devido ao encontro de bons hospedeiros intermediários e condições ambientais semelhantes a sua origem (KATZ e ALMEIDA, 2003).

TABELA 1: Características morfológicas, malacológicas, clínicas e epidemiológicas das espécies de Schistosoma de interesse médico

Espécie	Morfologia	Hospedeiro Intermediário	Distribuição Geográfica	Localização
<i>S. haematobium</i>	Ovos com espículo terminal	<i>Bulinus sp</i>	África/ Oriente Médio	Plexo Urinário
<i>S. intercalatum</i>	Ovos elipsóides com esporão terminal	<i>Bulinus sp</i>	África Central	Mesentéricas/ Plexo Urinário
<i>S. japonicum</i>	Ovos com espículo lateral	<i>Oncomelania sp</i>	China, Japão, Filipinas	Veia Porta/ Mesentéricas
<i>S. mekongi</i>	Ovos com rudimento de espículo lateral	Neotricula aberta	Sudeste Asiático	Veia Porta/ Mesentéricas
<i>S. mansoni</i>	Ovos com espículo Lateral	Gênero <i>Biomphalaria</i> (<i>B. glabrata</i> , <i>B. straminea</i>)	África, Antilhas, América do Sul e Central	Veia Porta/ Mesentéricas

3.1.1. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E EPIDEMIOLOGIA

A esquistossomose é uma doença endêmica, amplamente distribuída em países dos continentes Asiático, Africano e Americano, incluindo neste o Brasil, sendo reconhecida como a segunda mais importante dentre as doenças parasitárias (FIGURA 1) (TDR, 2004). Dados da literatura relatam que, entre as 200 milhões de pessoas atualmente infectadas, 120 milhões são sintomáticas e entre essas, 20 milhões desenvolvem a forma grave da doença. Estimam-se que, a nível mundial, 500-600 milhões de pessoas ainda estejam em áreas de risco de infecção (KATZ e PEIXOTO, 2000; WHO, 2006).

Schistosoma mansoni é a espécie responsável pela esquistossomose intestinal e hepática, possuindo como hospedeiro intermediário caramujos do gênero *Biomphalaria*, e tendo como principal hospedeiro definitivo o homem, além de roedores e primatas. Acomete países da África, Oriente Médio, Américas do Sul e América Central (GRYSSELS et al., 2006).

Na África, há baixos índices de esquistossomose mansoni na porção Norte, porém os maiores focos são encontrados na região do delta do Nilo e no sul do Saara, onde existem

85% de todos os casos de esquistossomose no mundo (WHO, 2006). Na Ásia apenas ocorrem focos na Arábia Saudita, Iêmen e Oman. Na América Central e América do Sul, os locais de infecção estão em vários estados do Brasil, Venezuela, Suriname, Porto Rico, República Dominicana e Antilhas (ROSS et al., 2002).

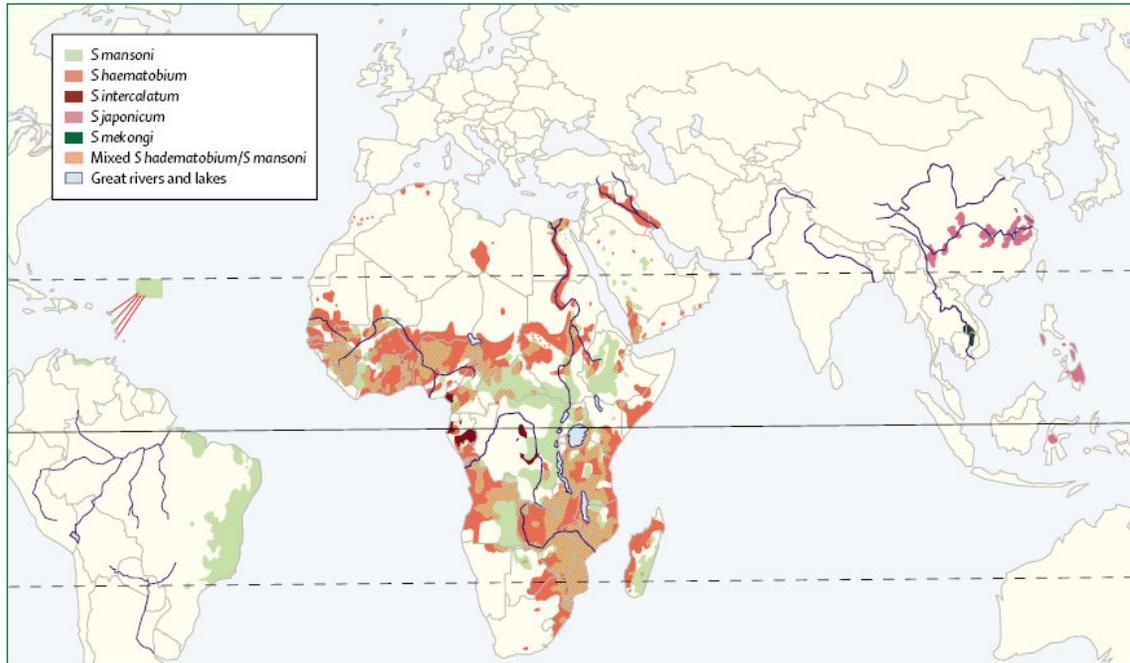


FIGURA 1: Distribuição Mundial da Esquistossomose
(GRYSSELS et al., 2006)

No Brasil, a doença afeta 19 estados desde o Maranhão até Minas Gerais, concentrando-se na Região Nordeste, especialmente nos estados de Pernambuco, Alagoas e Sergipe (FIGURA 2). Focos isolados têm ocorrido no Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás e Distrito Federal, porém o número de casos vem aumentando na Região Sul do país (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul) devido a maior mobilidade populacional (REY, 2001). Estimativas indicam que no Brasil existam 25 milhões de pessoas em situação de risco de adquirir a doença, e entre cinco e seis milhões de indivíduos infectados (KATZ e PEIXOTO, 2000; REY, 2001).

Barbosa e colaboradores (2006), utilizando dados da Fundação Nacional de Saúde, constataram que Pernambuco está entre os estados que exibem prevalência média mais elevada (20,5%) de pessoas infectadas pelo *S. mansoni*, apresentando taxas de infecção humana crescentes, havendo localidades na região da Zona da Mata, que atingem 80% de indivíduos parasitados com prevalência crônica. Historicamente considerada como uma

doença endêmica rural, principalmente nas regiões canavieiras do estado, a esquistossomose está gradualmente expandindo-se, devido ao êxodo de trabalhadores rurais para as regiões costeiras do Estado, sendo facilmente encontrada na Região Metropolitana do Recife, além de novos sítios de transmissão detectados em regiões de turismo e férias de verão, como Porto de Galinhas (BARBOSA et al., 2001).

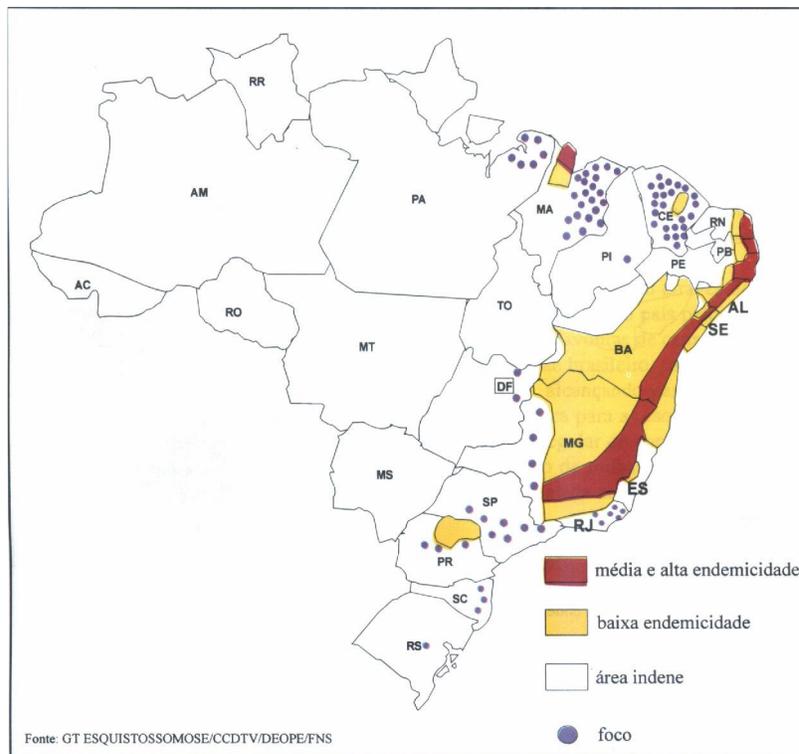


FIGURA 2: Distribuição da esquistossomose mansoni no Brasil (BRASIL, 1998)

Devido aos esforços da Fundação Nacional de Saúde, ocorreu uma redução da taxa de mortalidade em Pernambuco de 3,75, em 1979, para 2,04 por cem mil habitantes, em 1996, e queda das internações por esquistossomose de 6,07, em 1984, para 4,51, em 1998 (CARMO, 1999). Entretanto, a prevalência por esquistossomose, no período de 1983 a 1995, foi superior a 30,0% em alguns municípios do Estado de Pernambuco (FIGURA 3) (RESENDES, SANTOS e BARBOSA, 2005).

O miracídio apresenta forma cilíndrica, com média de 180 µm de comprimento por 64 µm de largura. Sua superfície está revestida por células epidérmicas e ciliadas, as quais permitem seu movimento em meio aquático (FIGURA 4). Em sua porção anterior encontra-se uma papila apical que se assemelha a uma ventosa, e nela estão as terminações das glândulas adesivas de penetração (NEVES et al., 2005).

Os esporocistos são formados pela descamação do epitélio ciliado do miracídio, durante penetração no molusco, transformando-se em um saco alongado constituído por uma parede sincicial de fibras musculares, com aglomerados de células germinativas em seu interior (REY, 2001).

As cercárias apresentam corpo ovóide e achatado com uma cauda bifurcada, cujo comprimento total equivale a 500 µm (FIGURA 4). Seu corpo cercariano é formado por duas ventosas, uma oral e outra ventral, um primórdio de sistema digestivo, sistema nervoso e glândulas de penetração, medindo de 70 a 190 µm; sua cauda bifurcada mede de 50 a 230 µm, e apenas tem função de movimentação da larva em meio aquático, perdendo-a durante penetração através da pele do hospedeiro definitivo (OLDS e DASARATHY, 2000).

O esquistossômulo representa a fase juvenil do verme adulto, originado durante penetração da cercária na pele do hospedeiro definitivo, com perda de sua cauda e sua reorganização fisiológica, pois a larva perde o glicocálix, alonga-se e adquire o aspecto vermiforme. Ele alcançará seu desenvolvimento completo quando encontrar um meio adequado para seu total amadurecimento, transformando-se em verme adulto (REY, 2001).

O verme adulto macho mede, em média, 10 mm de comprimento por 1,1 mm de diâmetro. Apresenta cor esbranquiçada e seu tegumento é grosseiro, recoberto por minúsculas projeções ou tubérculos (FIGURA 4). Em sua porção anterior há uma ventosa oral e uma segunda ventosa, a ventral ou acetábulo. Sua porção posterior possui uma fenda longitudinal, chamada canal ginecóforo, onde a fêmea aloja-se para fecundação. Seu aparelho genital possui de 6 a 9 massas testiculares as quais abrem-se diretamente no canal ginecóforo, fazendo os espermatozóides alcançarem a fêmea (GRYSEELS et al., 2006).

O verme adulto fêmea mede aproximadamente 14 mm de comprimento por 0,16 mm de diâmetro, sendo então mais longa e delgada que o macho (FIGURA 4). Aparenta uma coloração mais escura e acinzentada, por possuir o tegumento mais liso, dando-lhe o aspecto transparente, permitindo a melhor visualização da hemozoína, pigmento derivado da digestão do sangue em seu aparelho digestivo. Em sua porção anterior encontra-se a ventosa oral e acetábulo, semelhante ao macho, seguindo-se da vulva, útero (com um ou dois ovos) e ovário; e em sua porção posterior há as glândulas vitelogênicas e o ceco (ROSS et al., 2002). Os

esquistossomos alimentam-se de sangue e globulinas por glicólise anaeróbica. Os restos são regurgitados para o sangue do hospedeiro (GRYSSELS et al., 2006).

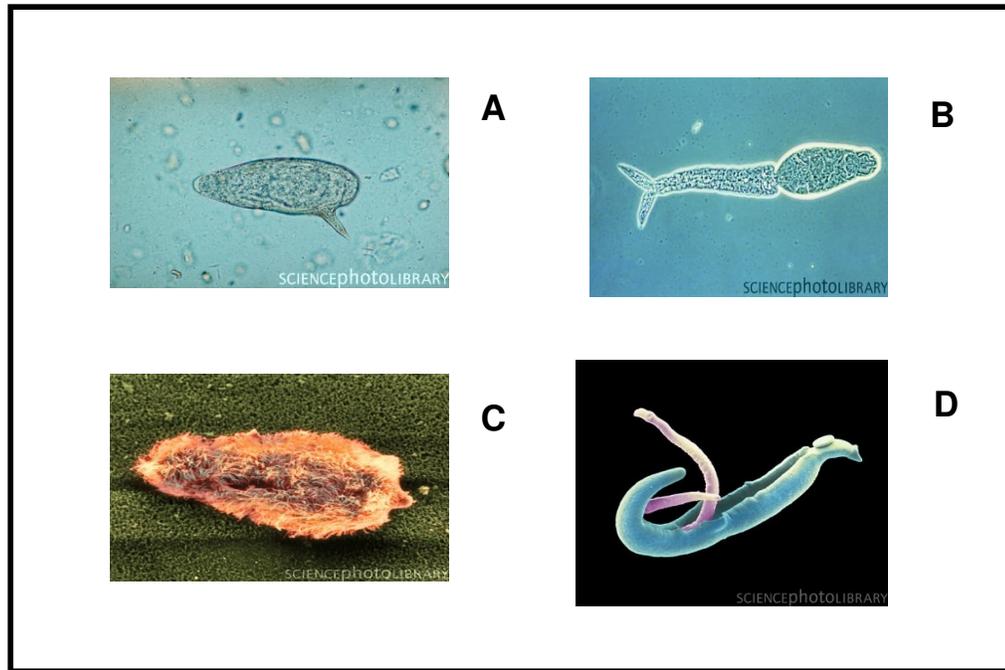


FIGURA 4: Formas evolutivas do *S. mansoni*. A) ovo; B) miracídio; C) cercária; D) vermes adultos macho e fêmea (SCIENCE PHOTO LIBRARY, 2007)

3.1.3. CICLO BIOLÓGICO

O *S. mansoni* possui um complexo ciclo de vida, no qual interage extremamente com seus respectivos hospedeiros, definitivos e intermediários, e com o meio ambiente em que vive. Os vermes adultos habitam preferencialmente as vênulas do plexo hemorroidário inferior e as ramificações das veias mesentéricas do hospedeiro vertebrado, especialmente a mesentérica inferior, onde migram para submucosa intestinal, e as fêmeas fazem a oviposição. Cada fêmea põe, em média, 400 ovos/dia, os quais levam cinco dias para amadurecer (NEVES et al., 2005). Da submucosa eles atingem a luz intestinal, em um período de 6 dias, onde são eliminados para o meio externo junto com o bolo fecal. Ao encontrar um adequado meio aquático, e sob influência de luminosidade, temperatura e oxigenação, os ovos liberam seus miracídios, os quais nadam durante algumas horas, até entrar em contato com moluscos aquáticos do gênero *Biomphalaria*, e penetrar por seus tecidos moles. Após esta ação, os miracídios transformam-se em esporocistos (FIGURA 5), que por poliembrionia geram

esporocistos-filhos, e estes têm a capacidade de gerar cercárias e outros esporocistos-filhos (REY, 2001). Um único miracídio pode formar de 100 a 300 mil cercárias, com sexo determinado (OLDS e DASARATHY, 2000).

Os caramujos começam a liberar cercárias 4-6 semanas após infecção, pela à formação de vesículas em seu epitélio, e elas em meio aquático nadam através de movimentos vibratórios e circulares até encontrar um hospedeiro vertebrado, e penetrar ativamente por sua pele, onde perdem a cauda e transformam-se em esquistossômulos (FIGURA 5). Aqueles que não são destruídos pelo sistema imunológico do hospedeiro, seguem através da corrente sanguínea, passando pelo coração, pulmões e fígado. Nos vasos do sistema porta-hepático, eles alcançam a fase adulta, acasalam-se e migram para as vênulas da parede intestinal, onde o ciclo começa novamente (ROSS et al., 2002). Um verme adulto vive, em média, 3-5 anos, mas pode alcançar 30 anos. O potencial teórico de reprodução de um par de vermes é de aproximadamente 600 bilhões de esquistossomos (GRYSSELS et al., 2006).

3.1.4. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A sintomatologia da esquistossomose é influenciada por fatores como cepa do parasito, carga parasitária, idade, estado nutricional e resposta imune do paciente (NEVES et al., 2005). De acordo com estes, os indivíduos parasitados podem permanecer assintomáticos ou apresentar sintomas mais graves, os quais podem acarretar suas mortes.

Logo após o contato infectante, alguns indivíduos se queixam de manifestações pruriginosas na pele, chamada de dermatite cercariana. Ela é decorrente da morte na pele de até metade das cercárias que penetram, e pode durar de 24-72 h pós-infecção, podendo estender-se por 15 dias. Caracteriza-se por micropápulas eritematosas e pruriginosas, semelhantes a picadas de inseto ou eczema de contato, sendo muitas vezes não reconhecidas em áreas endêmicas (BOTTIEAU et al., 2006).

Após 40 dias pode desenvolver-se a fase aguda da doença, a qual muitas vezes é assintomática, porém alguns indivíduos apresentam sintomas leves como febre, prostração, dores musculares, cefaléia, diarreia, tosse seca e sudorese. A maioria dos pacientes recupera-se após 2-10 semanas, mas alguns desenvolvem uma forma persistente com toxemia, hepatoesplenomegalia, e leucocitose com eosinofilia. A fase aguda raramente é vista em populações expostas cronicamente, ela é mais comum em turistas, viajantes e outras pessoas expostas acidentalmente a transmissão (HATZ, 2005; JELINEK et al., 1996).

A fase crônica não ocorre devido aos vermes adultos, mas sim aos ovos que prendem-se aos tecidos durante migração peri-intestinal ou após embolização do fígado, baço, pulmões e sistema cérebro-espinhal, provocando inflamação eosinofílica e reação granulomatosa, que gradativamente dá lugar a depósitos fibróticos (CHEEVER et al., 2000). A doença resulta de deposição maciça de colágeno nos espaços periportais, induzindo a Fibrose de Symmers. Esta fibrose produz uma oclusão progressiva da veia porta, hipertensão portal, esplenomegalia, circulação venosa colateral e varizes esofagianas. Em infecções por *S. mansoni*, este processo fibrótico pode levar de 5-15 anos (DESSEIN et al., 1999).

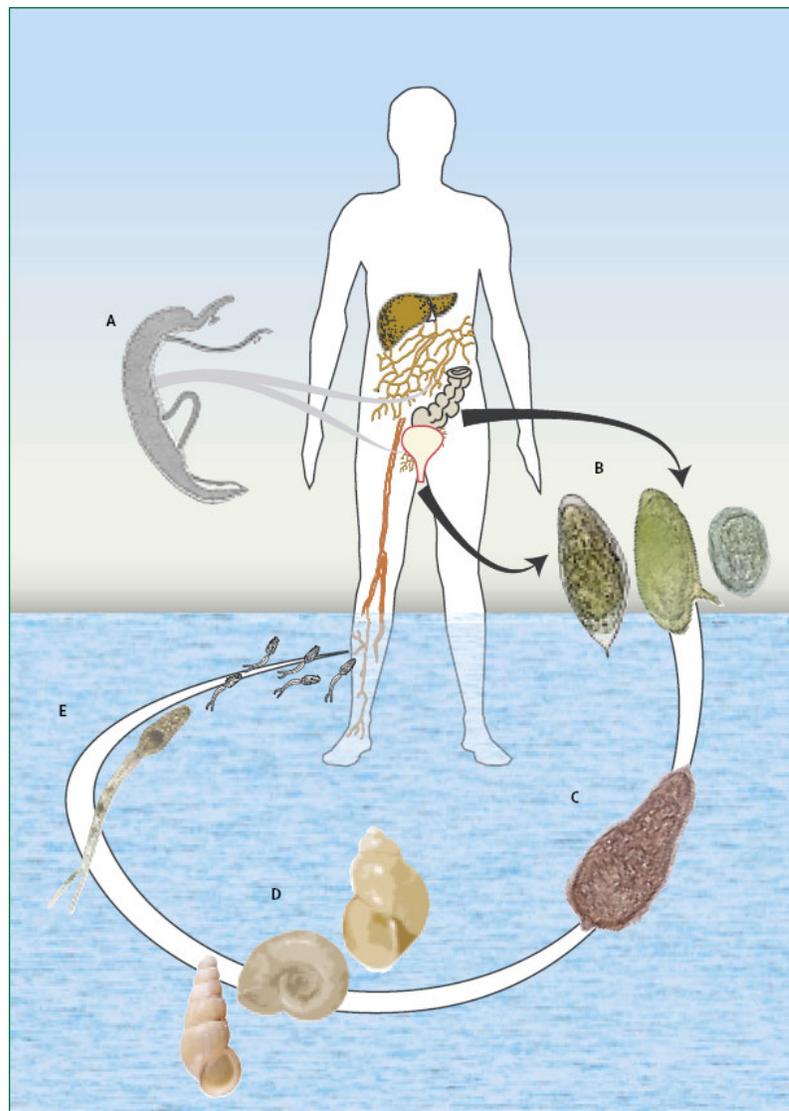


FIGURA 5: Ciclo Biológico do *Schistosoma*
(GRYSSELS et al., 2006)

A doença ainda pode acarretar lesões cardiopulmonares como arteriolite obstrutiva, insuficiência pulmonar direita e hipertensão pulmonar provocada por obstrução vascular induzida por ovos, vermes mortos ou imunocomplexos Ag-Ac. O depósito de complexos imune nas áreas mesangiais também pode levar a glomerulonefrite (BARSOUM et al., 2004). Lesões no aparelho reprodutor de homens e mulheres também ocorrem em áreas endêmicas, facilitando a transmissão sexual de outras doenças, e podendo induzir infertilidade (POGGENSEE e FELDMIEIER, 2001). E, lesões do sistema nervoso central decorrentes de inflamação ao redor de vermes ou ovos localizados ectopicamente, podem envolver danos fibróticos irreversíveis se não forem tratados (FERRARI, 2004).

3.1.5. IMUNOPATOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

A esquistossomose mansoni produz uma dicotomia da resposta imune, onde nos primeiros dias de infecção, antes da oviposição, ocorre uma resposta Th1 (WYNN et al., 1993), seguida, após a deposição de ovos no fígado do hospedeiro, por um aumento drástico das citocinas Th2 (GRYZCH et al., 1991).

Na fase inicial da doença observa-se edema e infiltração de neutrófilos e linfócitos, além de uma tardia invasão de eosinófilos no local onde ocorreu a penetração da cercária no hospedeiro, causando um eritema papular pruriginoso (COURA, 2005). Também existem evidências de que macrófagos ativados por IFN- γ destroem cercárias ao penetrar na pele, e esquistossômulos no pulmão, demonstrando assim uma resposta Th1 (SMYTHIES et al., 1996).

Essa resposta Th1, considerada pró-inflamatória, apresenta níveis elevados de IL-1, IL-6, TNF- α (RIBEIRO DE JESUS, 2002), IFN- γ e IL-2, e tem início através da produção precoce de IL-12 pelas células acessórias. Inicia-se desde a infecção até cerca de cinco semanas após a infecção, quando tem início a inflamação granulomatosa causada pelos ovos depositos (STADECKER e HERNANDEZ, 1998).

Na fase crônica da esquistossomose, existe uma melhora no quadro clínico do hospedeiro, devido à diminuição da resposta Th1, pela baixa produção de IFN- γ , e aumento dos níveis de citocinas Th2, como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 (ARAUJO et al., 1996). Uma função importante do perfil de resposta Th2 durante a infecção é prevenir, através das citocinas produzidas, a produção ou os efeitos de mediadores inflamatórios potenciais (PEARCE e MACDONALD, 2002).

Esta ausência de IFN- γ deve-se principalmente à modulação efetuada pela IL-10 (ARAÚJO et al., 1996). A IL-10 foi identificada como o principal fator responsável pela inibição da síntese de citocinas pelas células Th1 (MOSMANN et al., 1990), e sua produção tem início a partir da deposição dos ovos pelos vermes adultos fêmeas, continuando com níveis elevados nos estágios crônicos posteriores (SHER et al., 1991). Portanto, concluiu-se que a IL-10 diminui a quantidade das populações de células Th1 inflamatórias, ou torna-as anérgicas, levando ao desenvolvimento de uma resposta Th2 estável (FLORES-VILLANUEVA et al., 1996).

A resposta imunológica aos ovos de *Schistosoma*, em consequência à produção de citocinas Th2, produz uma reação granulomatosa composta por agregados de leucócitos inflamatórios, como linfócitos, macrófagos e eosinófilos, colocados numa matriz extracelular fibrosa (STADECKER et al., 2004), a partir dos ovos depositos pelo verme adulto fêmea na veia mesentérica que são carregados até o fígado, e dele não conseguem sair (PEARCE e MACDONALD, 2002).

A resposta Th2 leva à formação de lesões fibrosas periportais no fígado e intestino, geralmente encontradas perto ou dentro dos granulomas, e o desenvolvimento dessas lesões é atribuído às atividades da IL-4, IL-13 e TGF- β (HOFFMANN, WYNN e DUNNE, 2002). Porém, estudos posteriores demonstraram que a IL-13 é a citocina mais importante no processo de formação de tecido fibroso (CHIARAMONTE et al., 1999).

3.1.6. DIAGNÓSTICO

O diagnóstico laboratorial da esquistossomose faz-se pelo encontro de ovos do parasito (padrão ouro), ou por detecção de anticorpos em testes imunológicos (FELDMEIER e POGGENSEE, 1993).

A demonstração da presença de ovos do parasito é feita através de técnicas as quais podem utilizar a sedimentação espontânea dos ovos, Método de Lutz ou Método de Hoffman, Pons e Janer; ou pela avaliação quantitativa da carga parasitária, Método de Kato-Katz, que se baseia na clarificação da amostra fecal por glicerina e água, facilitando a visualização dos ovos. Este último é um método comumente utilizado em campo, pois permite a quantificação da infecção pela contagem dos ovos, usualmente expressas por gramas de fezes (ENGELS et al., 1996). Existe uma técnica, chamada oograma, usada para contagem de ovos, de acordo com seu estágio evolutivo. Quando as fêmeas realizam a oviposição, estes ovos estão imaturos, e amadurem ao longo de seis dias, passando por estádios (1^o a 4^o imaturos) até

alcançar estágio maduro e ser eliminado junto com as fezes. Se eles não chegam às fezes, morrem em 12 dias após maturação, e tornam inviáveis. Portanto, o oograma é muito utilizado para avaliação de novas drogas, pois assim sua atividade pode ser avaliada em poucos dias após tratamento (SARVEL et al., 2006).

Os métodos imunológicos são utilizados para demonstrar a resposta do organismo do hospedeiro à presença de antígenos do parasito, devido à existência de anticorpos ou reações alérgicas. Estes ensaios são sensíveis, porém não distinguem história de exposição de infecção ativa, além disso pode haver reação cruzada com outros helmintos, e eles não são facilmente aplicáveis em campo (GRYSSELS et al., 2006). As técnicas mais utilizadas são: reação de fixação do complemento, reação periovular, reação cercariana, imunofluorescência indireta, ELISA e reação intradérmica (teste alérgico) (NEVES et al., 2005; REY, 2001).

3.2. TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

A principal ferramenta para o controle da esquistossomose está no tratamento dos indivíduos infectados. A procura por drogas quimioterápicas começou por volta de 1920, e até 1984 a estratégia para o controle da doença estava centrada na eliminação dos moluscos. A partir de então, a WHO recomendou uma mudança na quimioterapia, resolução esta motivada pelo aumento da disponibilidade do fármaco antiparasitário, praziquantel (SANTOS, ALMEIDA e LEITE, 2006). O desenvolvimento deste fármaco, em 1970, e seu amplo uso nos anos subsequentes foi essencial para a redução significativa na mortalidade e morbidade causada pela esquistossomose (BERGQUIST, 2002).

O praziquantel (PZQ) é uma pirazino-isoquinolina com um centro assimétrico (FIGURA 6). Suas preparações comerciais são compostas de proporções iguais dos isômeros ópticos ativo leve (-), e do inativo dextro (+). A atividade esquistossomicida do levógiro tem sido estabelecida por experimentos *in vivo* (ANDREWS et al., 1983; LIU et al., 1986; TANAKA et al., 1989; WU et al., 1991; XIAO et al., 1999) e *in vitro* (STAUDT et al., 1992; XIAO e CATTO, 1989).

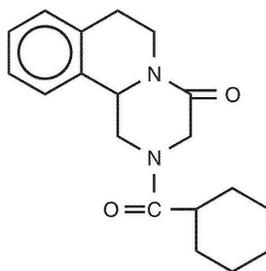


FIGURA 6: Praziquantel
(2ciclo-hexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolin-4-ona)

Várias razões fazem do praziquantel o principal agente esquistossomicida disponível comercialmente, entre outras: 1) alta eficácia contra todas as espécies de *Schistosoma* e cestodas; 2) mínimos efeitos colaterais; 3) administração sob a forma de dose única oral; e, 4) baixo preço (CIOLI et al., 1995; FENWICK et al., 2003; HAGAN et al., 2004).

O praziquantel vem sendo comercializado sob o nome de Biltricide®, como tabletes de 600mg (GRYSSELS et al., 2006). O tratamento é feito por dose única oral de 60 mg/kg de peso corporal, para crianças com até 15 anos, e 50 mg/kg de peso corporal, para adultos (BRASIL, 2007). Porém, em infestações pesadas recomenda-se administrar duas doses de 25

ou 30 mg/kg, separadas por um intervalo de quatro horas (REY, 2001). Seus efeitos adversos incluem náuseas, vômitos e dor abdominal. Em infecções graves, pode ocorrer cólica aguda com diarreia sanguinolenta após tratamento, provavelmente provocada pela massiva destruição dos vermes e liberação de antígenos (STELMA et al., 1995).

Apesar do amplo uso do praziquantel e três décadas de pesquisa, seu exato mecanismo de ação ainda é desconhecido (CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2004). Sabe-se que o praziquantel interfere com a homeostase do cálcio (GREENBERG, 2005) promovendo uma contração muscular sustentada (FETTERER et al., 1980), e ruptura do tegumento que leva à exposição de antígeno na superfície do verme (MEHLHORN et al., 1981). Um possível alvo que acarreta os eventos dependentes de Ca^{++} na presença de praziquantel foi descrito por Kohn e colaboradores (2001, 2003). Os autores clonaram subunidades β dos canais de Ca^{++} das bibliotecas de cDNA de *S. mansoni* e *S. japonicum*, e detectaram que elas apresentam duas substituições de aminoácidos no consensus de fosforilação da proteína Kinase C. A expressão funcional dessa subunidade β junto a uma subunidade α_1 humana, leva a uma drástica redução na amplitude da corrente elétrica. Este efeito não usual foi revertido na presença de praziquantel. Então, parece que a ausência de sítios de fosforilação na subunidade β dos canais de Ca^{2+} regulados por voltagem, do parasito, está diretamente ligada a sensibilidade ao praziquantel desta, antes insensível, subunidade α_1 (KOHN et al., 2001, 2003).

Apesar de todas as vantagens do praziquantel, existem algumas ameaças ao seu uso como terapia única. Uma dessas ameaças é o aumento da manifestação aguda da doença, na qual o praziquantel não é efetivo. A fase aguda, conforme descrito anteriormente, é comum em indivíduos que não têm contato prévio com antígenos do parasito, e eventualmente infectam-se em áreas endêmicas (ROCA et al., 2002). Essa preocupação confirma-se através de estudos onde parasitas imaturos mostraram-se praticamente insensíveis ao praziquantel em sua dose padrão (PICA-MATTOCCIA e CIOLI, 2004).

O desenvolvimento de resistência ao fármaco não é um problema de saúde pública hoje, porém é preocupante para um futuro próximo. Alguns relatórios têm modificado as perspectivas com relação a este assunto. Fallon e Doenhoff (1994) produziram uma cepa de *Schistosoma* em laboratório pela mistura de quatro diferentes isolados geográficos, e após sete tratamentos com doses orais subcurativas de praziquantel, 93% dos vermes sobreviveram a 3 doses de 300 mg/kg, tratamento que deixou apenas 10% de sobreviventes na cepa original não selecionada. Em 1991, uma população do Senegal tratada com a dose padrão de 40mg/kg, apresentou uma baixa taxa de cura de 18% (STELMA et al., 1995). Essa mesma população

tratada com a mesma dose de PZQ, e re-avaliada após 6 semanas, novamente mostrou baixa média de cura (GRYSSELS et al., 1994). Fallon e colaboradores (1997) testaram a susceptibilidade de esquistossomos oriundos de moluscos do Senegal, e demonstraram que estes vermes foram menos sensíveis ao praziquantel do que àqueles mantidos em laboratório. O monitoramento de alguns trabalhadores tem sido feito no Egito, onde, em 1992, alguns indivíduos não apresentaram cura para esquistossomose, e alguns isolados resistentes têm sido identificados e mantidos (ISMAIL et al., 1999).

Em contraste, a associação de esquistossomicidas e esteróides tem dado resultados excelentes, principalmente para tratamento da esquistossomose aguda, cuja abordagem terapêutica ainda é desconhecida (GELFAND et al., 1981; FARID et al., 1987). Coker (1957) e Harrison e Doenhoff (1983) relataram vários experimentos em que a administração de cortisona aumentou a resistência natural de camundongos à infecção por *S. mansoni*. Trabalhos com dexametasona *in vivo* têm demonstrado atividade esquistossomicida efetiva (LAGRANGE, 1963; NEWSOME, 1963) concluindo que este esteróide induz mudanças que levam a estabilização da função hepática e inibição da fibrogênese (WEINER, 1987). Lambertucci e colaboradores (1989) trataram camundongos infectados com esquistossomicidas associados aos esteróides dexametasona e prednisolona, demonstrando acentuada redução na contagem de ovos liberados nas fezes, e no intestino e fígado.

Apesar destes fatos, o praziquantel ainda se mantém como o principal fármaco contra esquistossomose, e não seria justificado interromper seu uso em muitas áreas onde ele ainda é um benefício para a população. Provavelmente será necessário modificar as estratégias de quimioterapia em áreas como as apresentadas acima, onde há perigo de seleção de cepas resistentes (CIOLI et al., 1995). Além disso, deve-se implementar programas para detecção dos primeiros sinais de desenvolvimento de resistência, e restringir a quimioterapia em massa para grupos de risco como mulheres, trabalhadores e escolares (FENWICK et al., 2003).

3.3. TESTOSTERONA

Em 1930, a testosterona foi pela primeira vez caracterizada como um hormônio sexual masculino. Produzido principalmente pelos testículos, e em proporções menores pelas adrenais, ovário e placenta, este andrógeno é responsável pela estimulação e controle do desenvolvimento e manutenção das características masculinas, em vertebrados (HANDELSMAN e LIU, 2005).

Por fazer parte do grupo de hormônios esteróides, sua estrutura química é derivada do ciclo pentanoperidrofenantreno, um composto que consiste de quatro anéis não planares fusionados (A, B, C e D). Sua molécula contém 19 átomos de carbono, além de dois radicais metilas, nas posições C10 e C13, um grupo cetônico na posição C3, e uma hidroxila na posição C17 (FIGURA 7).

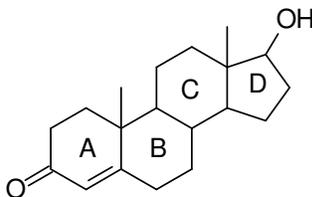


FIGURA 7: Testosterona
(17β-hidróxi-4-androsten-3-um)

3.2.1. BIODISSÍNTese

As células produtoras de hormônios esteróides utilizam como precursor o colesterol, o qual pode ser obtido por: 1) meio de sua síntese dentro da célula, a partir do acetato; 2) através de sua mobilização das reservas depositadas em gotículas intracelulares, sob a forma de ésteres de colesterol; e, 3) a partir das lipoproteínas plasmáticas, seja de baixa densidade (LDL), ou de alta densidade (HDL) (DORNAS et al., 2006). Para que uma célula possa captar colesterol circulante, ela deve apresentar um receptor de membrana capaz de se ligar a uma lipoproteína específica. As células produtoras de hormônios esteroidais apresentam estes receptores. Após a ligação com seus receptores, as LDLs e HDLs internalizam-se por endocitose, e os componentes protéicos são hidrolisados, liberando-se o colesterol não-esterificado. Este pode ser imediatamente utilizado na biossíntese dos esteróides, ou ser reesterificado e armazenado em vacúolos lipídicos, para posterior utilização (RODRIGUES e FAVARETTO, 1999).

A primeira etapa de síntese consiste da clivagem de parte da cadeia lateral da molécula de colesterol, originando a delta-5-pregnenolona. Esta reação é catalisada por uma forma de citocromo P-450 existente no interior das mitocôndrias (CHUNG et al., 1986). Em seguida a pregnenolona é lançada para o retículo endoplasmático, onde é processado de acordo com o tipo celular e tipo de hormônio. Nas células adrenais, responsáveis pela síntese dos glicocorticóides, ela é hidroxilada nas posições 17 e 21 e desidrogenada na posição 3-beta. Na zona glomerulosa do córtex adrenal, após a 11-beta-hidroxilação que origina corticosterona, ocorre uma nova hidroxilação para a formação da aldosterona (STOCCO, 2001).

Nas células de Leydig do testículo, a partir da pregnenolona, a síntese de testosterona pode processar-se por duas vias principais: Δ_4 e Δ_5 . Na via Δ_4 , a dupla ligação está no anel A, entre o C4 e C5, e é derivada da progesterona. A pregnenolona é convertida em progesterona pela 3 β -hidroxiesteróide-desidrogenase; a 17 α -hidroxilase e 17,20-desmolase ativam a transformação da progesterona em 17 α -hidroxiprogesterona e androstenodiona, respectivamente; e a 17 β -OH-esteróide-desidrogenase catalisa a transformação da androstenodiona em testosterona (FIGURA 8) (KRETSER, 2007).

Na via Δ_5 , onde a dupla ligação está no anel B, a pregnenolona é convertida pela ação da 17 α -hidroxilase, em 17-OH-pregnenolona. Esta sob ação da 17,20-desmolase, origina a desidroepiandrosterona (DHEA), que se transforma em androstenodiol, pela ação da enzima 17 β -OH-esteróide-desidrogenase. O androstenodiol converte-se em testosterona pela ação da 3 β -hidroxiesteróide-desidrogenase (FIGURA 8) (POLLACK et al., 1997).

Outros produtos de menor atividade androgênicas também são secretados pelas gônadas: a androstenodiona, dehidroepiandrosterona (DHEA), androstenodiol e diidrotestosterona. Além disso, os andrógenos são os precursores obrigatórios dos estrógenos, especialmente androstenodiona e testosterona, que são chamados andrógenos aromatizáveis, e nas células da granulosa nos ovários em presença de 17 β -hidrogenase, sofrem aromatização do anel A e desmetilação do C10, originando estrona e estradiol (RODRIGUES e FAVARETTO, 1999).

O LH e o FSH são os reguladores hipofisários coordenados da função gonadal. Através de retroalimentação negativa, sua síntese e secreção são aumentadas por diminuições nos esteróides gonadais. As células de Leydig, estimuladas pelo LH, secretam testosterona, e este por sua vez inibe a secreção de LH, agindo tanto ao nível do hipotálamo, inibindo a secreção de GnRH (hormônio liberador de gonadotrofinas), como da hipófise, bloqueando o efeito estimulante do GnRH (BERNE et al., 2004).

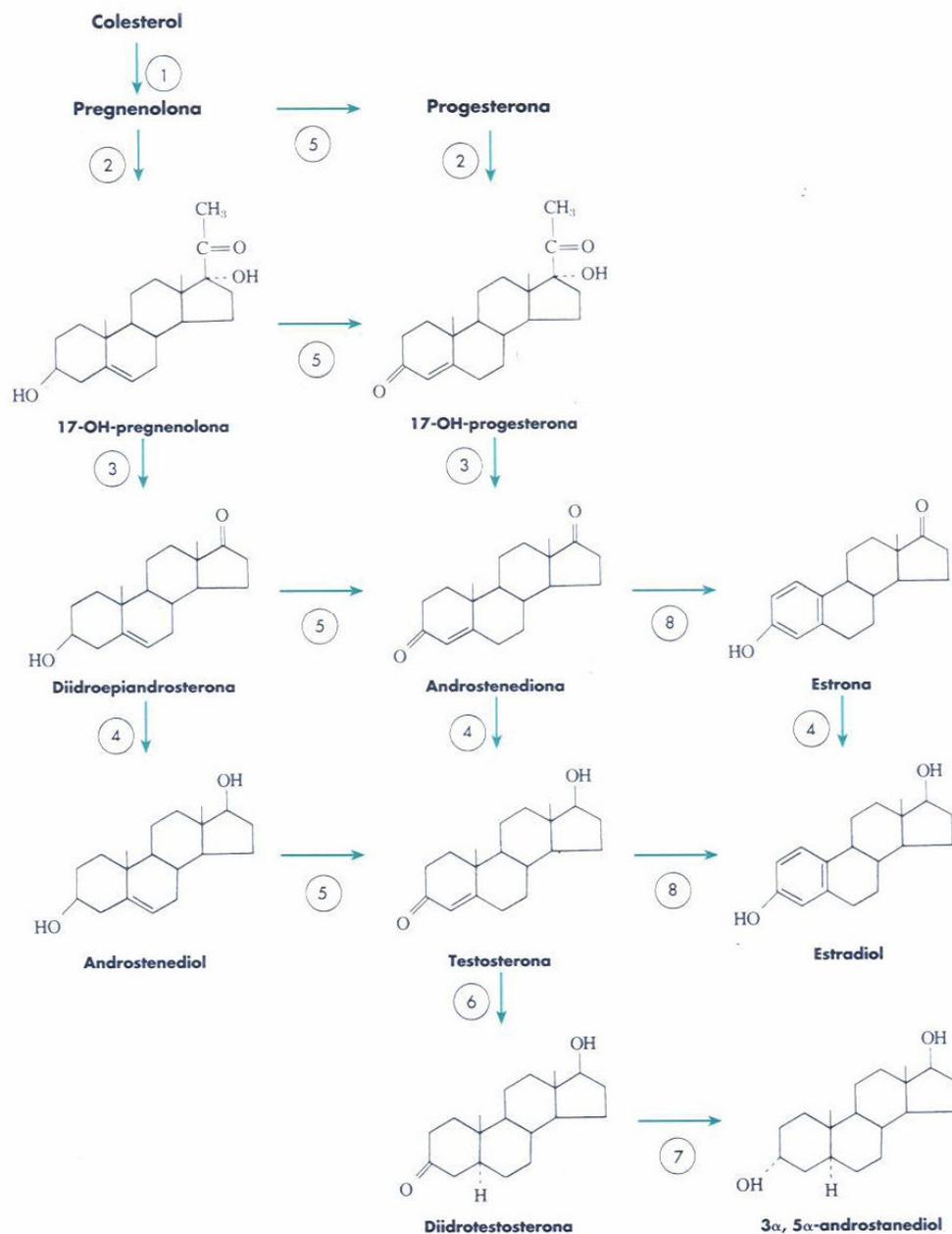


FIGURA 8: Vias de Síntese dos Andrógenos

- 1) 20,22-desmolase; 2) 17 α -desmolase; 3) 17,20-desmolase; 4) 17 β -OHesteróide-desidrogenase;
5) 3 β -OHesteróide-desidrogenase; 6) 5 α -redutase; 7) 3 α -redutase; 8) 17 β -hidrogenase

A concentração plasmática de testosterona durante os 10 primeiros anos de vida é baixa (5-10ng/dL). No decorrer da puberdade ocorre um aumento constante, dos 10 anos aos 16-18 anos, estabilizando-se nos adultos (500-800ng/dL). A secreção deste andrógeno é pulsátil, obedecendo ao ritmo de secreção do hormônio luteinizante (LH) (ROY et al., 1999).

Um grande pico de concentrações das gonadotropinas (LH e FSH) ocorre no plasma fetal no meio da gestação; antes do nascimento estas diminuem, e aumentam novamente aos 2 meses de idade, porém diminuem e são secretadas em níveis muito baixos durante toda a infância (FIGURA 9). O amadurecimento dos neurônios hipotalâmicos durante a puberdade leva a uma maior síntese e liberação de GnRH; aumentando também a produção e armazenamento de LH pela hipófise, e elevando rapidamente os níveis de testosterona em homens. Conforme os níveis de testosterona aumentam durante a puberdade, eles agem elevando os níveis do hormônio do crescimento, e agindo em sinergismo eles produzem um aumento de massa óssea e muscular (HULL e HARVEY, 2002).

A testosterona pode ter os seguintes destinos na sua ação sobre os tecidos dependentes de andrógenos: 1) como testosterona livre, entra por difusão simples ou facilitada na célula-alvo, liga-se ao receptor nuclear específico, e desencadeia os processos fisiológicos e bioquímicos característicos; 2) dentro da célula-alvo de vários tecidos podem sofrer a transformação em diidrotestosterona (DHT); 3) em tecidos como o hipotálamo, hipófise e tecido adiposo, sob a ação de enzimas aromatizantes, transformam-se em 17β -estradiol; e 4) ser metabolizada e transformada em compostos de baixa atividade androgênica (17-cetosteróides, dióis e trióis) (ROY et al., 1999).

3.2.2. FUNÇÕES DOS ANDRÓGENOS

Durante a vida intra-uterina, os andrógenos são os responsáveis pela diferenciação sexual do hipotálamo e pela virilização da genitália interna e externa, sendo a diidrotestosterona (DHT) a principal responsável nesta fase. Quando se inicia o processo puberal, verificam-se as modificações sobre os órgãos sexuais secundários e caracteres sexuais secundários, com o aparecimento dos primeiros sinais de atividade testicular, alterações morfológicas do escroto, aumento do tamanho testicular e, em seguida do pênis, aparecimento dos pêlos, modificações da distribuição de gordura no tecido subcutâneo, aumento do crescimento linear, da massa muscular e esquelética, alterações no timbre da voz e desenvolvimento das glândulas sebáceas. A testosterona é o principal hormônio necessário para o início e manutenção da espermatogênese, além disso, os andrógenos também prolongam a vida do espermatozóide epididimal (WILSON, 2001).

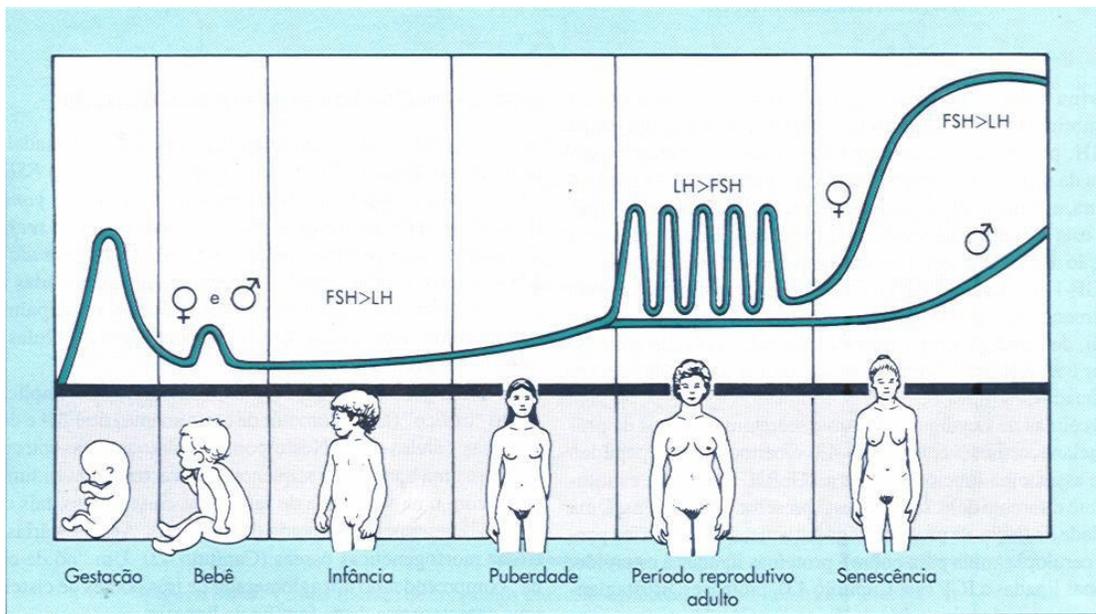


FIGURA 9: Padrão de secreção de gonadotropinas ao longo da vida (BERNE et al., 2004)

Os andrógenos possuem intensa ação sobre o metabolismo protéico, glicídico e lipídico. Causam retenção de nitrogênio, sódio, potássio, cloretos e fósforo inorgânico. O metabolismo basal aumenta de 5 a 15% durante tratamento androgênico. A testosterona aumenta os níveis circulantes de colesterol ligado às lipoproteínas de baixa densidade (LDL), e reduz os níveis de colesterol ligado às lipoproteínas de alta densidade (HDL). Também favorece o acúmulo de gordura na região abdominal e visceral. Estes efeitos são associados ao maior risco de doença cardiovascular em homens do que em mulheres (BERNE et al., 2004).

A testosterona ainda apresenta atividade sobre o estímulo da síntese de eritropoetina e amadurecimento de precursores eritróides; o número de glóbulos vermelhos e o hematócrito são mais elevados em indivíduos do sexo masculino, diferença esta que desaparece com a castração; supressão da síntese hepática de globulina ligadora de cortisol e de eritropoetina; supressão do crescimento da glândula mamária; início do impulso sexual; e estímulo do comportamento agressivo (RODRIGUES e FAVARETTO, 1999).

3.2.3. DIFERENÇAS IMUNOLÓGICAS ENTRE OS SEXOS

As diferenças sexuais na função imune são bem estabelecidas em vertebrados, fato comprovado pela maior prevalência de infecções parasitárias em machos do que em fêmeas,

sejam humanos ou não (ROBERTS et al., 2001). Esta diferença na intensidade de infecção poderia ser explicada por diferenças de exposição e fatores comportamentais entre os sexos, que aumentariam a probabilidade de contato com os parasitas, já que machos são mais agressivos e maiores em compleição física do que as fêmeas da mesma espécie (MOORE e WILSON, 2002). Entretanto, vários estudos referem a existência de diferenças imunológicas entre os sexos, e que estas podem aumentar o parasitismo em machos. Por exemplo, machos geralmente exibem menores respostas imunes do que fêmeas, as quais apresentam resposta inata, resposta mediada por anticorpos e resposta celular maior do que machos (SCHUURS e VERHEUL, 1990).

A primeira linha de defesa contra parasitas é a imunidade inata, a qual é imediata e não requer exposição prévia. Machos e fêmeas diferem em intensidade de resposta inflamatória, onde fêmeas respondem mais do que machos, teoria que poderia explicar porque mulheres desenvolvem mais resposta auto-imune do que homens (DA SILVA, 1995). A atividade fagocítica de neutrófilos e macrófagos, e a produção e liberação de prostaglandinas E_2 , tromboxano B_2 e óxido nítrico após estimulação antigênica, também é maior em fêmeas do que em machos (SPITZER, 1999; MONDAI e RAI, 1999; Du et al., 1984). As células apresentadoras de antígenos (APC) (WEINSTEIN et al., 1984), e a expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II em astrócitos, células endoteliais e microglia são mais eficientes em fêmeas do que de machos (BARNA et al., 1996). Por outro lado, as concentrações plasmáticas de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6 e TNF- α , são maiores em machos após trauma (DIODATO et al., 2001). Com relação à atividade de células natural killers (NK), alguns estudos ilustram que mulheres têm menor atividade NK do que homens (YOVEL et al., 2001), enquanto em outros estudos, a exposição de células *in vitro* ao estradiol aumenta a atividade NK (SORACHI et al., 1993).

A resposta humoral, a qual se baseia na produção de anticorpos pelas células B, é tipicamente maior em fêmeas. A resposta imune mediada por células também difere entre os sexos, havendo heterogeneidade funcional e fenotípica. Dependendo da infecção, fêmeas exibem preferencialmente um perfil de resposta Th2, com produção elevada de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 (BIJLSMA et al., 1999), porém há relatos de que fêmeas tem um maior perfil Th1, com maiores concentrações de IFN- γ (BARRAT et al., 1997).

A hipótese prevalente para as diferenças imunológicas entre os sexos é aquela em que os hormônios sexuais podem influenciar o sistema imune. A localização de receptores para estes hormônios, em especial testosterona estradiol e progesterona, em linfócitos, macrófagos,

granulócitos e mastócitos, indicam que existam conexões diretas entre sistema endócrino e imune (KLEIN, 2004).

Receptores para andrógenos, diidrotestosterona e testosterona, têm sido identificados no timo, medula óssea e baço de roedores, e também em cultura de macrófagos (WUNDERLICH et al., 2002). Exposição à testosterona *in vivo* reduz a atividade de células NK em camundongos (KLEIN, 2004). O estímulo de cultura de macrófagos *in vitro* com testosterona reduz a síntese de produtos pró-inflamatórios (TNF- α e óxido nítrico sintase), assim como também aumenta a síntese de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (TABELA 2) (D'AGOSTINO et al., 1999). Esses efeitos imunossupressores da testosterona devem acontecer devido aos efeitos inibitórios em fatores transcricionais (NF- κ B) que medeiam a produção de citocinas pró-inflamatórias (MCKAY e CIDLOWSKI, 1999). Além disso, os andrógenos suprimem a resposta imune por aumentar a expressão de proteínas de estresse, como as proteínas de choque térmico, e fatores de apoptose (JONES et al., 2000).

Os estrógenos modulam a função imune em fêmeas e contribuem para resistência contra infecção, por afetar a imunidade inata e adquirida. Exposição de células NK humanas a estradiol *in vitro* melhora sua atividade citotóxica (SORACHI et al., 1993). Os estrógenos também estimulam a síntese de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e TNF- α (TABELA 2) (MULLER e HUNT, 1996). Eles também podem aumentar a função imune em fêmeas por proteger as células imunológicas contra apoptose (VEGETO et al., 1999). A progesterona pode estimular ou inibir a resposta imune, mas é tipicamente imunossupressora. Ela suprime a resposta inata, incluindo atividade dos macrófagos e das células NK, assim como o sinal de transdução do NF- κ B e a produção de nitrato e óxido nítrico (TABELA 2). Por isso, a progesterona é considerada um hormônio anti-inflamatório (SAVITA e RAI, 1998; MULLER e HUNT, 1998).

Os glicocorticóides suprimem a resposta inata, humoral e celular, por diminuir a síntese de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, TNF- α e INF- γ , e pela produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 (TABELA 2) (DEL REY et al., 1984). Eles também alteram a produção de prostaglandinas e óxido nítrico. E como a testosterona, seus efeitos imunossupressores são explicados pelo antagonismo à resposta mediada por NF- κ B (MCKAY e CIDLOWSKI, 1999).

TABELA 2: Efeitos dos esteróides sexuais na resposta imune
(KLEIN, 2004)

Hormônio	Resultados imunológicos
Testosterona	↓ números de MΦ ↓ Produção de Nitrito por MΦ ↓ iNOS mRNA ↑ Produção de IL-10, IL-4, IL-5, IL-13 ↓ Produção de INFγ mRNA ↓ Produção de TNFα ↓ Produção de Anticorpos ↓ Células T CD4+ e CD8+
Estradiol	↓ Produção de Nitrato por MΦ ↑ Fagocitose por MΦ ↑ Degranulação de Eosinófilo ↑ Atividade NK ↑ Produção de IL-1, IL-6 e TNFα ↑ Apoptose por células T ↑ Produção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 ↑ Atividade de células B ↑ Produção de Anticorpos↑
Progesterona	↓ Produção de Nitrato por MΦ ↓ Produção de NO por MΦ ↓ Atividade NK ↓ Produção de TNFα ↑ Produção de IL-4, IL-5 ↓ Produção de Ig G e Ig A
Glicocorticóides	↓ Atividade NOS ↓ iNOS mRNA ↓ Atividade NK ↓ Atividade de NF-κB ↓ Produção de IL-1, IL-6 e TNFα ↓ Atividade IL-2 ↓ Produção de INFγ e TNFβ ↑ Produção de IL-4 e IL-10 ↓ Produção de anticorpos ↓ Células T CD8+

3.4. MODULAÇÃO DA ESQUISTOSSOMOSE PELA TESTOSTERONA

Populações de caramujos, densidade cercariana e padrões de contato humano com água contaminada mostram a forte variação temporal e espacial da esquistossomose, resultando em uma distribuição focal da infecção dentro de países, regiões e cidades. Tipicamente, a intensidade de pessoas infectadas aumenta de acordo com a idade, a partir da infância, com um pico em torno de 8-15 anos de idade, e diminuindo em adultos (GRYSSELS et al., 1996). Estas características têm sido atribuídas à frequência de contato com água contaminada e à imunidade inata e adquirida. Entretanto, o padrão de infecção também pode estar relacionado ao sexo, a fatores ambientais, profissionais, culturais e religiosos (GRYSSELS et al., 2006).

As razões para o declínio da prevalência e intensidade de infecção por *Schistosoma* humano a partir da segunda década de vida ainda não estão bem entendidas. O sistema endócrino regula uma variedade de funções celulares e fisiológicas dos organismos como crescimento, reprodução e diferenciação. Ele pode influenciar o curso da infecção parasitária por modular o sistema imune, mas também pode ser explorado pelo parasita, para manter sua sobrevivência (ESCOBEDO et al., 2005). Em virtude destes fatos, a habilidade dos hormônios de afetar o sistema imune dirigido contra agentes patogênicos tem recebido maior atenção.

Os esteróides são implicados como um dos fatores que controlam o estabelecimento e patogênese da esquistossomose. Um recente estudo feito em babuínos e camundongos sugere o papel de hormônios do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) no controle da esquistossomose, especialmente regulando o estabelecimento, maturação e oviposição do *Schistosoma*, e entre estes hormônios está a dehidroepiandrosterona (DHEA) (MORALES-MONTOR et al., 2001). DHEA é um hormônio esteróide adrenocortical, comumente encontrado em sua forma sulfatada (DHEAS), e que sofre metabolização a testosterona no organismo. Ele é secretado antes do nascimento e a partir da puberdade, com pico entre os 20-29 anos (ABEBE et al., 2003), porém suas concentrações declinam após a terceira década de vida. DHEA possui uma atividade imunomodulatória, a qual já foi associada ao aumento da resposta imune a vacina contra *Influenza* (DANENBERG et al., 1997), no tratamento da criptosporidiose (RASMUSSEN et al., 1995), e em infecções por *S. mansoni* (FALLON et al., 1998). Estudos comprovam que os níveis sorológicos de DHEA aumentam substancialmente em adolescentes com idade entre 15-19 anos, período que coincide com o início do declínio na intensidade de pessoas infectadas, e o pico do nível de DHEA entre 20 e 29 anos, é a fase

onde há menor intensidade de infecção populacional (ABEBE et al., 2003). Além disso, cortisol e DHEAS, nas concentrações 60 mg/kg e 4,5µg/mL respectivamente, inibem a oviposição do *S. mansoni in vitro*; e DHEA, na concentração de 4,5µg/mL, tem forte atividade cercaricida, esquistossomulicida e esquistossomicida *in vitro* (MORALES-MONTOR et al., 2001).

Remoue e colaboradores (2002) verificaram que a testosterona tem a habilidade funcional de inibir a atividade enzimática da Sh28GST, enzima da família das glutationas-S-transferases essencial para a vida do parasito no hospedeiro por influenciar transporte, metabolismo e ação dos esteróides. Essa enzima foi identificada no tegumento, parênquima e órgãos germinais do *Schistosoma* (LIU et al., 1996), e tem sido uma candidata a vacina, pois a imunização com um recombinante da mesma reduziu a fecundidade de *S. haematobium* em macacos infectados experimentalmente (BOULANGER et al., 1999). A inibição da atividade enzimática da Sh28GST ocorreu devido ao reconhecimento da enzima por anticorpos específicos.

Alterações nas funções reprodutoras de mamíferos, portadores de esquistossomose, provocadas por diminuições nos níveis sorológicos de gonadotropinas (FSH e LH) e testosterona têm despertado a atenção da comunidade científica. Experimentos com ratos e hamsters (LANSOUD-SOUTAKE et al., 1991), e com coelhos (KASILIMA et al., 2004), mostraram que a infecção por *S. mansoni* pode prejudicar a função reprodutora por diminuir as concentrações plasmáticas de LH e testosterona. Em humanos, alguns estudos demonstraram que esquistossomose pode causar anomalias anatômicas dos órgãos genitais e efeitos adversos no sistema endócrino (SAAD et al., 1999), podendo haver diminuição na contagem de esperma (MOMEN et al., 1987), além disso esses achados podem estar associados a um aumento dos níveis sorológicos de estradiol e uma diminuição na testosterona (SAAD et al., 1999).

Entre crianças e adultos, a intensidade e prevalência das infecções causadas por *Schistosoma* em áreas endêmicas são maiores em homens do que em mulheres (DEGU et al., 2002). Essas diferenças poderiam ser atribuídas a vários fatores, incluindo comportamento, habitat, maior contato com água contaminada, maior exposição aos moluscos, e diferenças na pele que poderiam facilitar a penetração da cercária (SHIFF et al., 1972). Entretanto, conforme citado no parágrafo anterior, a infecção por *S. mansoni* diminui as concentrações plasmáticas de LH e testosterona, fazendo com que os homens apresentem elevada resposta pró-inflamatória, resposta humoral, perfil Th1 e Th2 (TABELA 3) (NAUS et al., 2003; ABEBE et al., 2001, REMOUE et al., 2001). Consequentemente, estes indivíduos apresentam

uma maior resposta inflamatória contra *S. mansoni*, desenvolvendo a forma mais grave da doença, com sintomas como hepatoesplenomegalia (MWATHA et al., 1998). Em contraste, uma resposta regulatória, incluindo síntese de IL-10 e TGF- β , que limitam e regulam as respostas inflamatórias, encontra-se maior em fêmeas (TABELA 3). A produção de Ig A, a qual protege contra re-infecção por *Schistosoma*, também é maior em fêmeas do que em machos (REMOUE et al., 2001).

TABELA 3: Diferenças imunológicas entre os sexos em resposta a infecção por *Schistosoma* (KLEIN, 2004)

Parasita	Hospedeiro	Resposta em machos	Resposta em Fêmeas
<i>Schistosoma mansoni</i> / <i>haematobium</i>	Humanos	↑ Ig G	↑ Ig A
		↑ Ig G1	↑ IL-10
		↑ Ig G2a	↑ TGF β
		↑ Ig G4	↑ Morte Celular de
		↑ Ig E	PBMC
		↑ INF γ	
		↑ TNF α	
		↑ Proliferação de PBMC	

Apesar de os machos serem mais susceptíveis do que as fêmeas a muitos parasitas, existem exceções onde eles são mais resistentes. É o caso de camundondos *Mus musculus* machos que são menos susceptíveis do que as fêmeas à infecção por *S. mansoni* (ELOI-SANTOS et al., 1992), enquanto as fêmeas desenvolvem maior resposta imune pró-inflamatória (BOISSIER et al., 2003). Além disso, a administração de testosterona protege contra infecção, enquanto a castração exacerba a carga parasitária e mortalidade após inoculação com *S. mansoni* (NAKASAWA et al., 1997). Estes efeitos são melhor observados quando a testosterona é administrada durante o desenvolvimento das formas imaturas do parasita.

A testosterona é usada clinicamente de duas formas, como terapia de reposição androgênica e terapia farmacológica. Na terapia de reposição androgênica o objetivo principal é recompor a exposição de andrógeno para todos os tecidos usando doses de testosterona exógena, e tem como principal indicação clínica a deficiência de andrógenos, devido a desordens do hipotálamo, pituitária e testículos de etiologia genética ou adquirida

(HANDELSMANN, 2005). A terapia farmacológica utiliza andrógenos objetivando encontrar efeitos benéficos em homens com doenças crônicas. Como terapia adjuvante, seus objetivos são melhorar a qualidade de vida e a morbidade de doenças fatais, como: anemia por insuficiência renal ou medular; insuficiência cardíaca ou respiratória crônica; doença auto-imune dependente de esteróide; AIDS, para ganho muscular; prevenção de ataques de angioedema hereditário; e, paliativo no câncer de mama terminal (HANDELSMANN, 2006).

Vários estudos demonstram que a dexametasona apresenta efeitos anti-inflamatório e antifibrótico, os quais podem ter importantes implicações no tratamento da esquistossomose, principalmente quando associados a esquistossomicidas, como o praziquantel. Esses resultados foram encontrados quando a administração dos esteróides iniciou-se duas semanas antes da infecção (HERMETO et al., 1994). Porém, sua administração crônica começando junto com a infecção também reduziu o número de ovos hepáticos, retardou a maturação e diminuiu o tamanho do granuloma, e reduziu a quantidade de fibrose, produzindo níveis sorológicos elevados de IL-10, e diminuição de INF- γ e IL-4 (PYRRHO et al., 2002). Este perfil sorológico está associado à prevenção da hiperpolarização para a resposta Th1 ou Th2, evitando aumento na média de mortalidade e morbidade (HOFFMAN et al., 2000).

Em virtude destes fatos, vários estudos foram realizados com o objetivo de confirmar dados da literatura, os quais mostram que o tratamento com testosterona durante infecção por *Schistosoma* está associada à menor carga parasitária, com alterações na contagem e viabilidade dos ovos, e histopatológicas do hospedeiro. Estes resultados podem ter implicações importantes no tratamento de portadores de esquistossomose, especialmente se a dose terapêutica do praziquantel necessária para a cura puder ser reduzida, devido ao tratamento combinado com a testosterona.

4. ANIMAIS, MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANIMAIS

4.1.1. Camundongos

Camundongos albinos suíços *Mus musculus*, fêmeas adultas, 30-40g, foram mantidos no Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) - UFPE, sob iluminação e temperatura controlados, com ração e água *ad libitum*.

4.1.2. Caramujos

Caramujos da espécie *Biomphalaria glabrata* foram mantidos pelo Moluscário da Disciplina de Parasitologia, do Departamento de Medicina Tropical, da UFPE.

4.1.3. *Schistosoma mansoní*

Todas as formas evolutivas do parasito, necessárias para este estudo, foram oriundas da cepa BH (Belo Horizonte), mantida pelo Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA).

4.2. MATERIAL

4.2.1. Praziquantel

O praziquantel (2-(cyclohexylcarbonyl)-1,2,3,6,7-11b-hexahydro-4H-pyrazino(2,1a) isoquinolin-4-one) foi adquirida da SIGMA ALDRICH CORPORATION (Lote 122K1443).

4.2.2. Testosterona

A terapia hormonal foi feita com Testosterone propionate (4-androstin-17 β -ol-3-one), adquirida da SIGMA ALDRICH CORPORATION (Lote 11H0995).

4.3. METODOLOGIA

4.3.1. Infecção de caramujos do gênero *Biomphalaria glabrata* com miracídio de *Schistosoma mansoni*

Fezes de camundongos infectados há cerca de sete semanas (45 a 50 dias) foram coletadas e tratadas de acordo com a técnica de sedimentação espontânea, pelo Método de Hoffman, Pons e Janer, ou de Lutz. Após este procedimento, o sedimento foi distribuído em placas de Petri e exposto à iluminação e à temperatura de 28°C, até eclosão dos ovos de *S. mansoni* e visualização dos miracídios em lupa. Grupos de dez miracídios foram pescados com a ajuda de pipetas de Pasteur, e colocados em placas separadamente. Um caramujo medindo cerca de 10 mm de diâmetro foi colocado em contato com cada grupo de miracídios, permanecendo exposto à luz e ao calor por mais duas horas. Após infecção, os moluscos foram postos em aquários com água desclorada, em ambiente protegido de luz. Todos esses procedimentos foram realizados segundo Standen (1952).

4.3.2. Infecção de camundongos *Mus musculus* com cercárias de *S. mansoni*

Os moluscos da espécie *B. glabrata*, em meio aquático e sob exposição à luz, têm a capacidade de eliminar cercárias através de seus tecidos moles. Após a obtenção de uma suspensão cercariana, os camundongos tiveram suas caudas emersas em uma fração desta suspensão, a qual continha, em média, 80 cercárias. Este procedimento está de acordo com a Técnica de Imersão Caudal (OLIVIER e STIREWALT, 1952). Os animais permaneceram nesta posição por duas horas, a 28°C e sob forte luminosidade, para facilitar a penetração das cercárias através da pele. Em seguida, os camundongos foram retirados e postos em suas respectivas gaiolas.

4.3.3. Tratamento

Todos os animais foram infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (cepa BH), e divididos em grupos tratados com praziquantel (PZQ), praziquantel + testosterona (PZQ + T), testosterona (T) e controle infectado, segundo protocolo realizado por Lambertucci e colaboradores (1989). A testosterona foi administrada em doses fisiológicas de 350 e 700 µg/camundongo (ZARROW, YOCHIM & MCCARTHY, 1964), via intraperitoneal em 0,1

mL de óleo de milho, duas vezes por semana, começando 10 dias antes da infecção até uma semana antes da leitura dos resultados, o qual ocorreu aos 70 dias pós-infecção (NAKASAWA et al., 1997). O praziquantel foi dissolvido em tween e água destilada, e administrado por via oral nas doses 250 e 83mg/kg, as quais representam 50 e 16,6% da dose máxima respectivamente, durante três dias consecutivos após 50 dias de infecção. Os grupos onde não houve administração de testosterona, receberam o mesmo volume de óleo de milho, e os grupos que não foram tratados com praziquantel receberam água potável. A avaliação foi feita quanto à carga parasitária, produção e viabilidade dos ovos, e histopatologia de tecido hepático e intestinal. A distribuição dos grupos experimentais de camundongos está representada na tabela 4.

TABELA 4: Distribuição dos grupos experimentais de camundongos, de acordo com doses de praziquantel e testosterona

GRUPO	TRATAMENTO
PZQ 1	Praziquantel (250mg/kg)
PZQ 1 + T	Praziquantel (250mg/kg) + Testosterona (350µg/camundongo)
PZQ 2	Praziquantel (83mg/kg)
PZQ 2 + T	Praziquantel (83mg/kg) + Testosterona (350µg/camundongo)
PZQ 3	Praziquantel (250mg/kg)
PZQ 3 + T M	Praziquantel (250mg/kg) + Testosterona (700µg/camundongo)
T	Testosterona (350µg/camundongo)
T M	Testosterona (700µg/camundongo)
CONTROLE	Não tratado

4.3.4. Contagem de ovos

Os camundongos foram analisados quanto à eliminação de ovos nas fezes, aos 49 dias de infecção, o que correspondeu à análise antes do tratamento com PZQ; aos 55 dias de infecção, período imediatamente após o término do tratamento com PZQ; e aos 64 dias de infecção, dia anterior à realização da perfusão do sistema porta. O método de Kato-Katz (KATZ et al., 1972) foi utilizado para analisar as amostras.

4.3.5. Contagem de carga parasitária

Todos os animais foram eutanasiados 15 dias após o término do tratamento. Os animais foram mortos por deslocamento cervical e submetidos à perfusão do sistema porta hepático, para retirada dos vermes, os quais foram separados em placas de Petri contendo salina a 0,85% , em seguida contados e classificados, de acordo com o sexo e vitalidade (DUVAL e DEWITT, 1967). Posteriormente foram retirados três fragmentos da porção distal do intestino delgado, para análise do oograma, e o fígado e uma porção do intestino, para análise histopatológica.

4.3.6. Viabilidade dos ovos

Três fragmentos retirados da porção distal do intestino foram lavados em solução salina e ligeiramente secados em papel absorvente. Posteriormente, os mesmos foram comprimidos entre lâmina e lamínula para realização da leitura (PELLEGRINO e FARIA, 1965). Os fragmentos foram microscopicamente analisados e 300 ovos, por camundongos, contados e classificados de acordo com os seus estádios de desenvolvimento. Os ovos foram classificados em: (i) ovos imaturos viáveis (de 1º a 4º estágio); (ii) ovos maduros viáveis; e, (iii) ovos inviáveis (calcificados, com miracídio retraído, semi-transparentes) (PELLEGRINO e KATZ, 1969).

4.3.7. Histopatologia

O fígado e intestino dos animais, retirados para processamento histopatológico, foram fixados com formol tamponado à 10% e em seguida colocados em álcool a 70%. Após a fixação, foram desidratados em uma bateria crescente de álcoois (80 a 100%), diafanizados em Xilol e incluídos em parafina; posteriormente foram realizados os cortes histológicos com espessura de 5µm (MICHALANY, 1980). Os cortes foram corados pela técnica de rotina com Hematoxilina & Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM), sendo em seguida montados entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan®, Merck). Após a montagem, a captura das imagens foi feita através de microscópio óptico (LEICA), com câmara digital acoplada a um computador com programa específico para análise de imagem, e os cortes representativos foram escolhidos de acordo com a melhor visualização das alterações histopatológicas nos tecidos do hospedeiro.

4.3.8. Análise dos Dados

A análise estatística foi realizada pelo Software Prism GraphPad, versão 3.00 para Windows. O Teste de Dunnett foi usado para comparação entre o grupo controle e os múltiplos grupos experimentais. As diferenças foram consideradas significantes em $P < 0,05$.

4.3. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo faz parte do projeto de pesquisa intitulado “Desenvolvimento e avaliação farmacológica e clínica de novos fármacos para esquistossomose” MCT/FINEP/CT SAÚDE Edital 01/2003, referência 1455/03, o qual possui autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE, Ofício nº 11/2004, para manipulação de camundongos em laboratório (ANEXO).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A associação da testosterona com o praziquantel (PZQ) no tratamento de camundongos albinos suíços infectados com *Schistosoma mansoni* revelou-se eficaz, melhorando a resposta terapêutica do praziquantel quando utilizado isoladamente. O praziquantel, na dose de 250 mg/kg, mostrou-se eficaz em reduzir a carga parasitária em 80,3% (TABELA 5). Sua associação com a testosterona, na dose 350µg/camundongo, aumentou em 13 % a eficácia dessa dose de praziquantel. O praziquantel, na dose de 83 mg/kg, foi ineficaz, como também o foi à testosterona sozinha (TABELA 5).

Tabela 5: Atividade esquistossomicida de diferentes doses do Praziquantel, associado ou não a testosterona, contra *S. mansoni* (cepa BH) em camundongos após 15 dias do término do tratamento.

Grupo	Número de vermes recuperados					Eficácia (%)
	Machos	Fêmeas	Total	Média	DP	
Controle	44	22	66	6,6	4,5	-
Testosterona (T)	39	24	63	7	2,4	-
PZQ 1	13	0	13	1,6	2,6	80,3
PZQ 2	44	26	70	7	1,8	-
PZQ 1 + T	3	1	4	0,5	0,7	93,65
PZQ 2 + T	52	29	81	8,1	3,7	-

Com relação à viabilidade dos ovos (FIGURA 10), observou-se ausência de estágio evolutivo após tratamento com as duas doses de praziquantel. No entanto, com a dose menor de praziquantel foram observados estádios jovens, indicando a recuperação de fêmeas, o que não foi visto com a dose maior, levando-nos a inferir uma cura parasitológica com esta última. A associação com testosterona não modificou esses resultados. Com relação aos ovos inviáveis observou-se que o tratamento dos camundongos com a testosterona sozinha, como também com PZQ nas duas doses, aumentou o número de ovos inviáveis em relação ao controle infectado. A associação do PZQ, em suas duas doses, com a testosterona aumentou o número de ovos inviáveis quando comparado ao controle infectado, porém em comparação ao tratamento com PZQ, as alterações foram insignificantes (FIGURA 10).

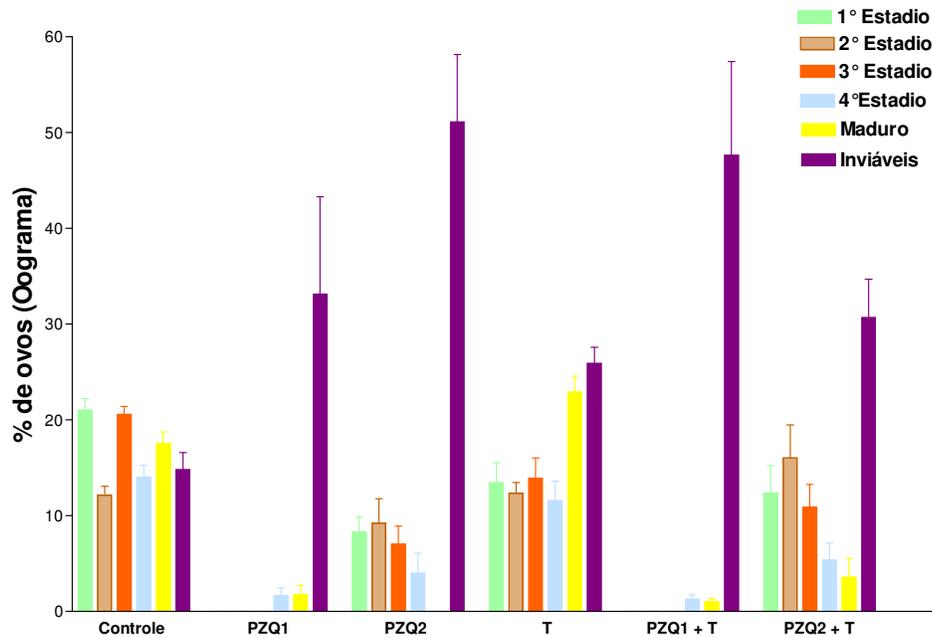


Figura 10: Oograma de camundongos eutanasiados após 15 dias do término do tratamento com Praziquantel (250 ou 83mg/kg) e/ou Testosterona (350µg/camundongo)

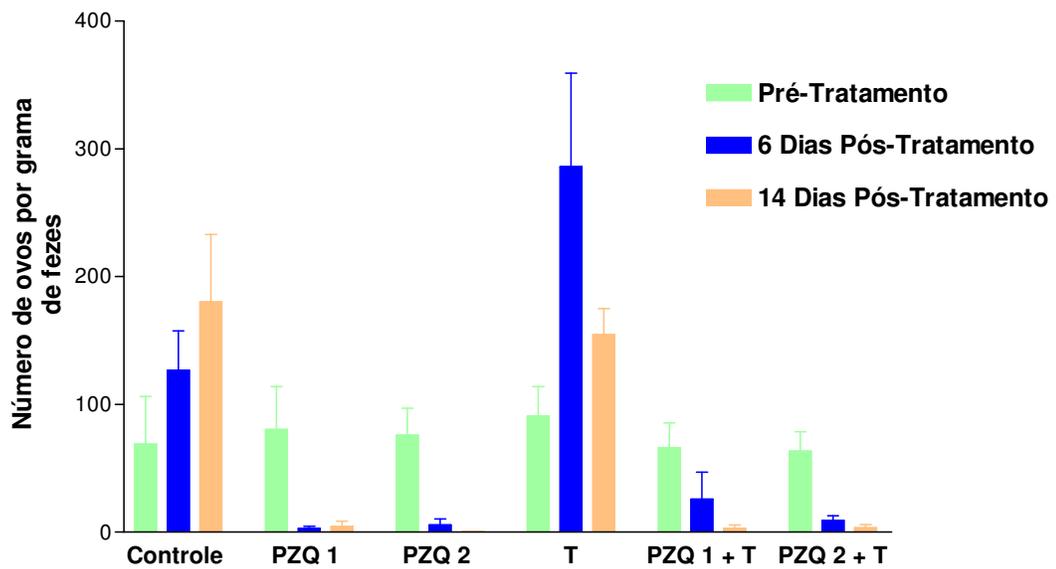


Figura 11: Média do número de ovos por grama de fezes de camundongos, nos grupos controle e tratados com Praziquantel (250 ou 83mg/kg) e/ou Testosterona (350µg/camundongo)

No que se refere a contagem de ovos nas fezes, o praziquantel nas duas doses utilizadas reduziu o seu número, em relação ao controle infectado. A associação com testosterona não alterou estes resultados. A testosterona sozinha não modificou o número de ovos em relação ao controle infectado, porém houve um acentuado decréscimo na contagem de ovos entre os dias 6 e 14 dias pós-tratamento, fato que não aconteceu no grupo controle (FIGURA 11).

O efeito da testosterona, sozinha ou em associação com o praziquantel, em aumentar o número de ovos inviáveis no intestino, e o efeito da associação com as duas doses do praziquantel em reduzir o número de ovos nas fezes, sugere que de alguma forma a testosterona foi eficaz como ovicida. Para magnificar o sinergismo da associação do praziquantel com a testosterona, a dose desse hormônio foi duplicada (700µg/camundongo), e este tratamento foi associado com praziquantel na dose de 250mg/kg.

Neste experimento, o tratamento utilizando apenas testosterona promoveu uma redução de 25,90% na carga parasitária (TABELA 6). O praziquantel sozinho reduziu o número de vermes em 73,05%, porém associação com testosterona aumentou esta redução em 22,75%, perfazendo uma diminuição total de 95,80% no número de vermes. O gráfico de redução no número de vermes está representado na figura 12.

Tabela 6: Atividade esquistossomicida de Testosterona (700µg/camundongo) e/ou PZQ (250µg/kg)

Grupo	Número de vermes recuperados				DP	Eficácia (%)
	Machos	Fêmeas	Total	Média		
Controle	167	26	193	38,60	5,03	-
Testosterona (T M)	112	31	143	28,60	5,595	25,90*
PZQ 3	43	9	52	10,40	3,43	73,05*
PZQ 3 + TM	8	5	13	1,625	1,685	95,80*

*P<0,001, comparado com o grupo controle

Esses resultados coincidem com os de outros autores, que observaram que a média de número de vermes recuperados de camundongos com altos níveis de testosterona, devido à administração exógena do hormônio, também foi significativamente menor, em relação aos animais com baixos níveis de testosterona devido à castração (Nakasawa et al,1997). Neste mesmo estudo, os autores deduzem que a testosterona atua no início da infecção, pois quando

sua administração iniciou-se após 10 ou mais dias de infecção, a carga parasitária foi semelhante a fêmeas normais, e machos castrados.

Fallon e colaboradores (1998), também obtiveram uma menor carga parasitária após tratamento com DHEA, hormônio esteróide que sofre metabolização à testosterona, e este efeito foi mais pronunciado em animais cujo tratamento começou duas semanas antes da infecção. Estes resultados indicam que o efeito protetor da testosterona parece ocorrer em resposta ao estágio migratório do parasita (esquistossômulo), e não ao verme adulto.

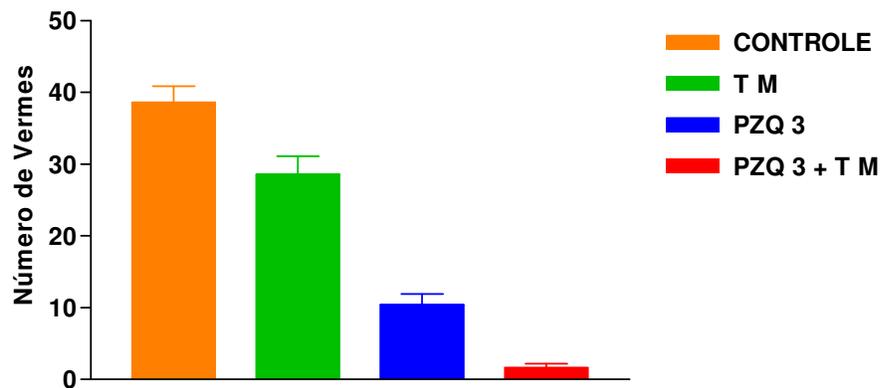


FIGURA 12: Redução da carga parasitária após tratamento com Testosterona (700µg/camundongo) e/ou PZQ (250µg/kg). (P<0,001)

Lambertucci e colaboradores (1989), estudando o sinergismo entre PZQ e os esteróides dexametasona e prednisolona, deduziram que estes podem bloquear ou atrasar o desenvolvimento de vermes afetados pelo esquistossomicida. Assim, uma explicação alternativa para o efeito da testosterona sobre a diminuição de carga parasitária obtida no presente experimento poderia ser semelhante, na qual a testosterona interaje com o *Schistosoma*, e afeta o desenvolvimento do esquistossômulo, seja interrompendo o ciclo biológico do parasita ou facilitando a ação do esquistossomicida sobre o mesmo.

Apesar do tratamento com uma dose maior de testosterona, a viabilidade dos ovos não apresentou alterações, sendo encontrado todos os estádios de evolução. Porém, a administração de testosterona associada ao praziquantel promoveu um aumento no número de ovos inviáveis (P<0,001), com redução dos ovos maduros, quando comparados aos resultados do controle não tratado (FIGURA 13). O aumento do número de ovos inviáveis no grupo tratado com a associação foi insignificante quando comparado ao grupo tratado apenas com praziquantel. Estádios jovens de evolução dos ovos (1º e 2º) também foram observados nos

grupos tratados com a associação de praziquantel e testosterona, ou apenas com o esquistossomicida, sem diferenças significativas entre eles, indicando recuperação das fêmeas.

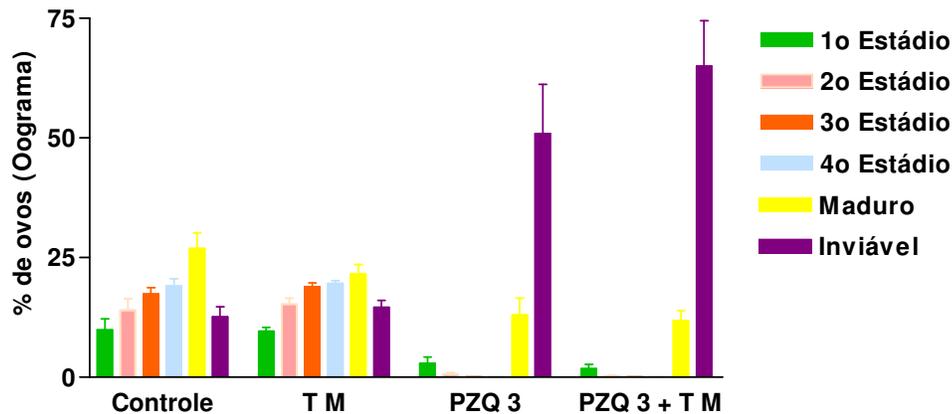


FIGURA 13: Oograma de camundongos infectados por *S. mansoni*, e tratados com Testosterona (700µg/camundongo) e/ou PZQ (250µg/kg)

A testosterona parece não afetar a fertilidade, e dessa forma a oviposição, das fêmeas de *S. mansoni*. Estudo realizado com tratamento exógeno de testosterona em camundongos fêmeas e machos castrados, também não apresentou diferenças significativas no número de ovos hepáticos entre os grupos experimentais e o controle (NAKASAWA et al, 1997). O tratamento com DHEA também não afetou a fecundidade das fêmeas (FALLON et al, 1998).

Estudos realizados com administração de dexametasona em camundongos infectados por *S. mansoni*, também não apresentaram alterações na cinética de oviposição do parasita, encontrando quantidades similares de ovos imaturos e maduros nos fragmentos intestinais (HERMETO et al, 1994), comparando-se animais tratados e controle. Todavia, este quadro acarreta um acúmulo de ovos nos tecidos, refletindo redução em sua eliminação, ficando os mesmos retidos no intestino como proposto por Lenzi e colaboradores (1989). Eles relacionaram este fato à ação indireta dos glicocorticóides sobre os eosinófilos, células que favorecem a passagem dos ovos pelo intestino, bloqueando sua eliminação pelas fezes.

Doenhoff e colaboradores (1978) também observaram um bloqueio parcial na excreção de ovos, onde o número de ovos produzidos pelos vermes continua o mesmo, porém ocorrem alterações na eliminação dos mesmos junto com as fezes, quando estudaram o

desenvolvimento da infecção por *S. mansoni* em animais imunossuprimidos, por tratamento com esteróides.

Com relação ao número de ovos liberados junto com as fezes, o tratamento com testosterona não modificou esta característica. A média de ovos por grama de fezes diminuiu consideravelmente nos dois grupos tratados com praziquantel, inclusive no grupo onde houve associação com testosterona, e no mesmo não foram encontrados ovos após 14 dias de tratamento com o esquistossomicida ($P < 0,05$).

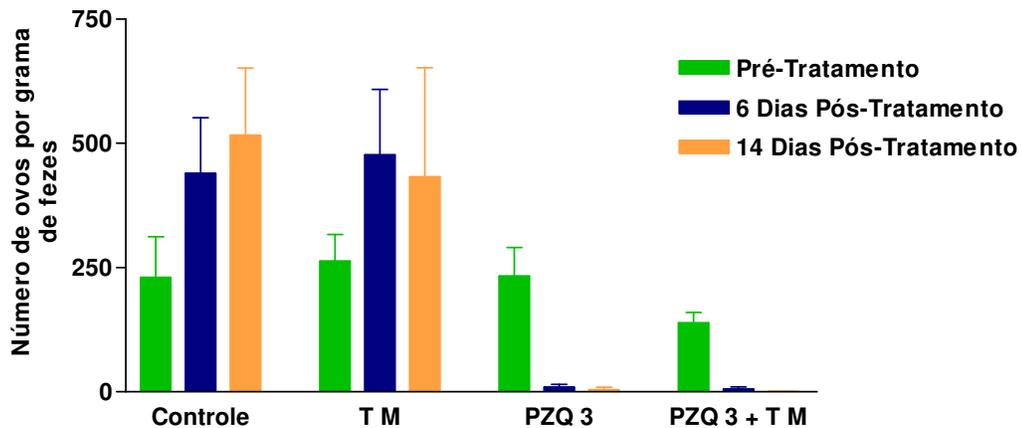


FIGURA 14: Média do número de ovos por grama de fezes de camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados com Testosterona ($700\mu\text{g}/\text{camundongo}$) e/ou PZQ ($250\mu\text{g}/\text{kg}$)

5.1. Resultados Histopatológicos

A inflamação granulomatosa em esquistossomose é uma reação de hipersensibilidade mediada por células a antígenos de ovos do parasita, que estão alojados no tecido hepático (REY et al, 2001). Os granulomas são compostos por uma área de necrose envolta por macrófagos, eosinófilos e linfócitos, havendo com o tempo, o aparecimento de uma área de cura com depósito de fibras de colágeno, um processo que leva a fibrose tecidual (LENZI et al, 1999). Na fase crônica da infecção, o alto número de granulomas e sua confluência pode induzir a hipertensão portal, sangramento gastrointestinal, e eventualmente, a morte (CHEEVER e YAP, 1997).

Os animais pertencentes ao grupo controle apresentaram reação inflamatória granulomatosa típica da patogenia da esquistossomose, com granulomas dispersos pelo parênquima hepático e mucosa intestinal, envoltos por fibras de colágeno (FIGURA 15). Os resultados histopatológicos dos animais tratados com testosterona, na dose 350µg/camundongo, não apresentaram diferenças morfológicas nos tecidos estudados (fígado e intestino) quando comparados aos resultados do controle (FIGURA 16). O tratamento com testosterona também não modificou o aspecto dos granulomas.

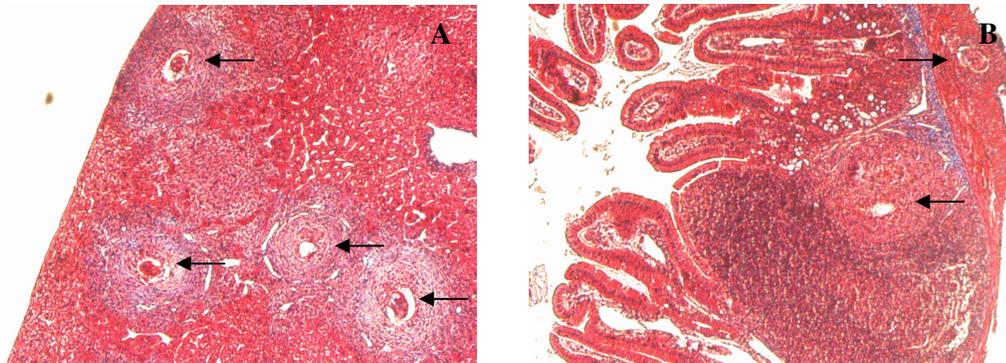


FIGURA 15: Fotomicrografias de granulomas esquistossomóticos em camundongos controle: A) granulomas dispersos no parênquima hepático em torno de resto de ovo (←), envolto por intenso emaranhado de fibras colágenas: T.M. (100X), B) Intensa reação linfocitária próxima a granuloma na lâmina própria da mucosa intestinal e presença de granuloma (←), também, na região da camada muscular externa: T.M. (100X).

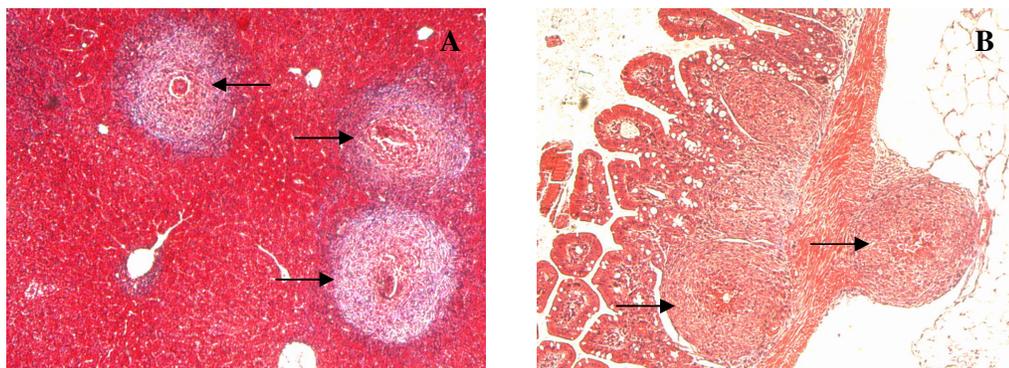


FIGURA 16: Fotomicrografias de granulomas esquistossomóticos em camundongos tratados com testosterona (T). A) granulomas hepáticos em torno de resto de ovo (←), envolto por intenso emaranhado de fibras colágenas: T.M. (100X), B) Intensa reação granulomatosa na lâmina própria da mucosa intestinal e na região da camada serosa (←): T.M. (100X).

O tratamento com o praziquantel, nas duas doses, foi eficiente com relação àquele instituído para os animais controle, uma vez que foi observada nítida preservação da mucosa intestinal desses animais. Contudo, a reação granulomatosa ainda se fez presente nos fígados dos mesmos, embora um pouco atenuada (FIGURA 17).

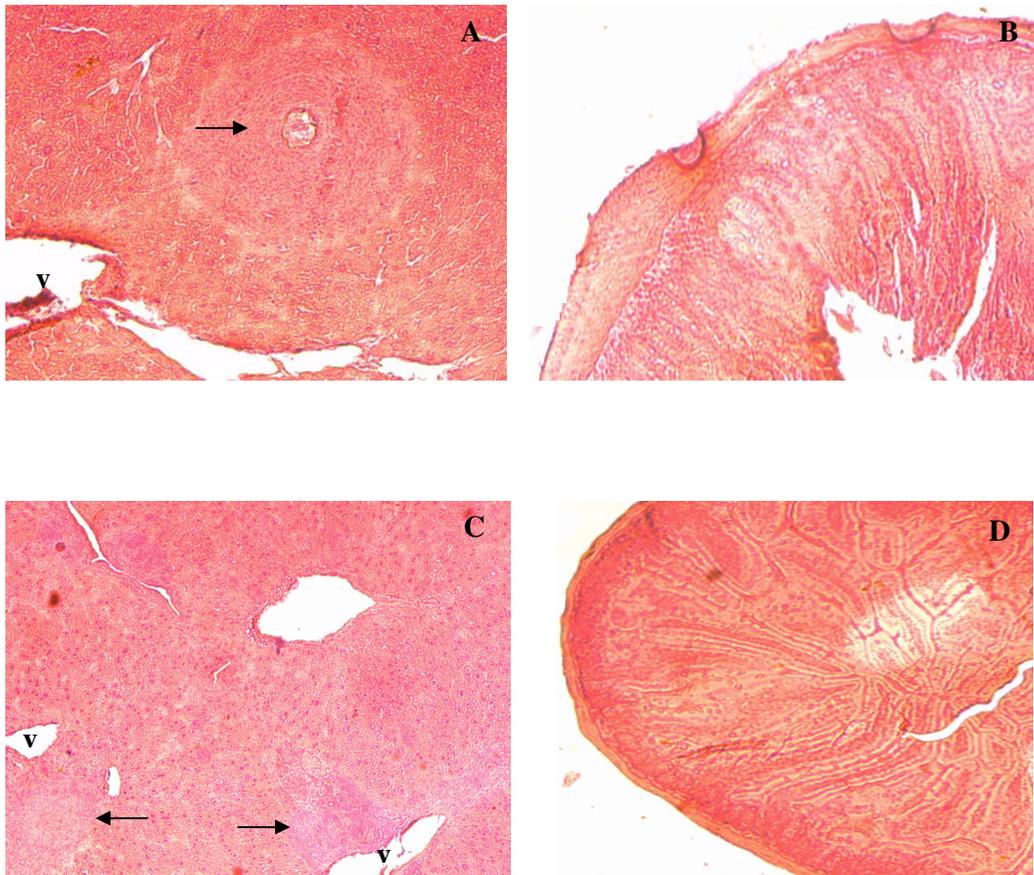


FIGURA 17: Fotomicrografias de fígado e intestino de camundongos tratados com praziquantel (250 ou 83mg/kg): A e B (PZQ 1); C e D (PZQ 2). A) granuloma hepático (←) circunscrito próximo à veia centrolobular (V): H.E. (100X), B) Mucosa intestinal preservada: H.E. (100X). C) granulomas ativados (←) próximos às veias centroloburares (V) no parênquima hepático: H.E. (100X), D) Mucosa intestinal preservada: H.E. (100X).

A associação do praziquantel com testosterona foi condizente com os resultados já mencionados para o tratamento com praziquantel, especialmente com relação ao grupo PZQ 1 + T. No entanto, não podemos inferir uma potenciação da resposta medicamentosa pela associação da testosterona, devido à observação de reação granulomatosa em tecido hepático de animais pertencentes ao grupo PZQ 1 + T, e em região de mucosa intestinal do grupo PZQ 2 + T (FIGURA 18).

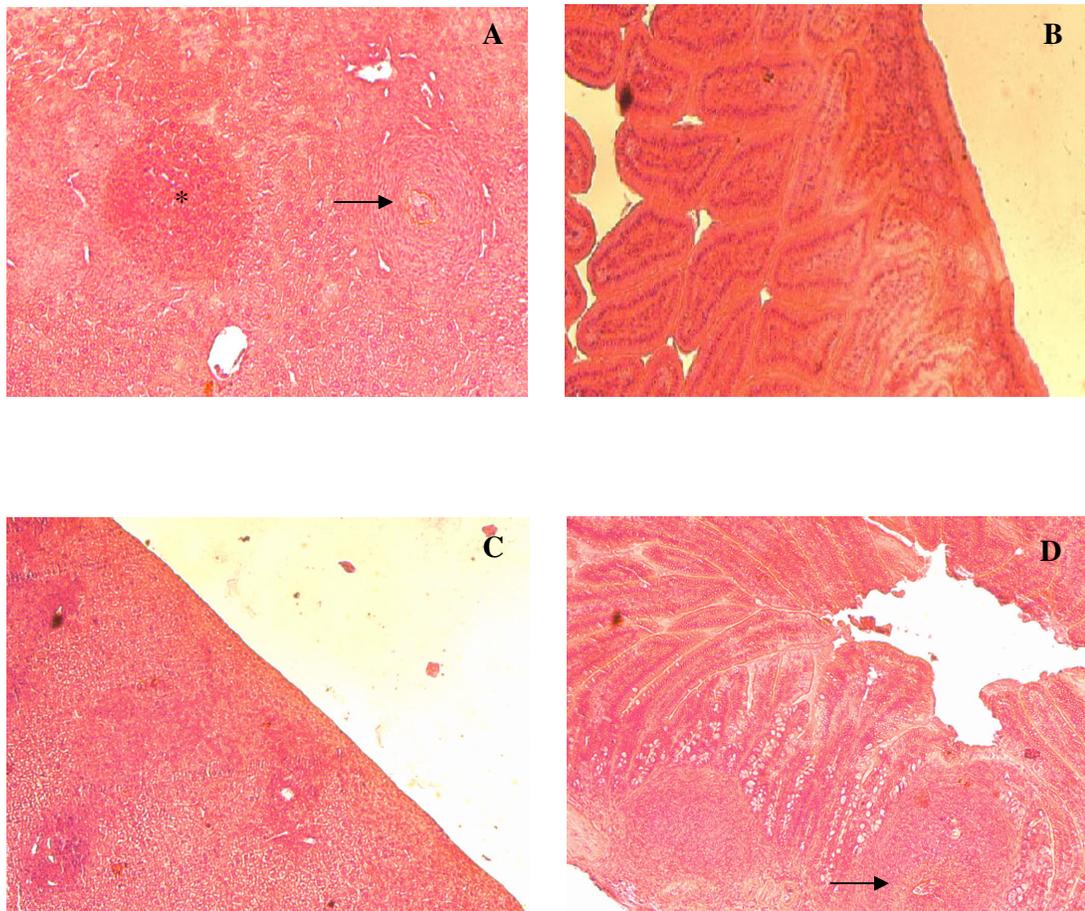


FIGURA 18: Fotomicrografias de fígado e intestino de camundongos tratados com praziquantel (250 ou 83 μ g/kg) e/ou testosterona (350 μ g/camundongo): A e B (PZQ 1+ T); C e D (PZQ 2 + T). A) Granuloma em fase de resolução (*) à esquerda, e granuloma (←) ativado à direita: H.E. (100X). B) Mucosa intestinal preservada: H.E. (100X). C) Parênquima hepático aparentemente preservado. D) reação granulomatosa em torno de restos de ovos (←) restritos a lâmina própria da mucosa intestinal: H.E. (100X).

No segundo experimento, os animais pertencentes ao grupo controle também apresentaram reação inflamatória granulomatosa típica da patogenia da esquistossomose, com granulomas dispersos pelo parênquima hepático e mucosa intestinal, envolvidos por fibras de colágeno (FIGURA 19). O tratamento com testosterona, na dose 700 µg/camundongo, não alterou os resultados histopatológicos, não havendo diferenças morfológicas nos tecidos estudados (fígado e intestino), ou diferenças no aspecto dos granulomas quando comparados ao controle (FIGURA 20).

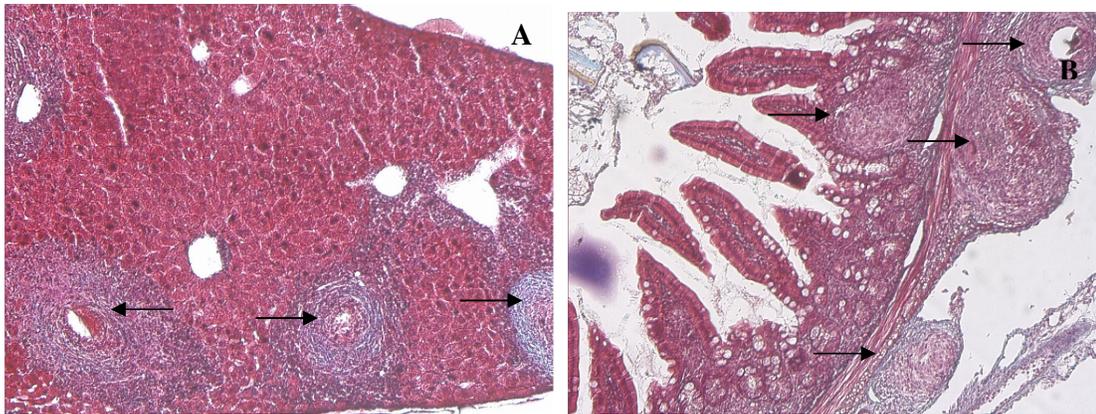


FIGURA 19: Fotomicrografias de granulomas esquistossomóticos em camundongos controle: A) granulomas dispersos no parênquima hepático em torno de resto de ovo (←), envolto por intenso emaranhado de fibras colágenas: T.M. (100X), B) Reação granulomatosa (←), também, na região da camada muscular externa: T.M. (100X).

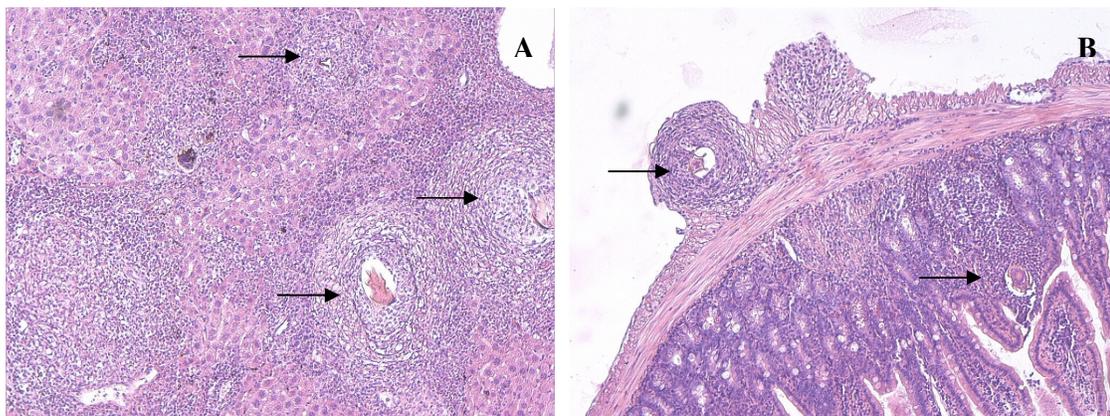


FIGURA 20: Fotomicrografias de granulomas esquistossomóticos em camundongos tratados com testosterona - 700µg/camundongo (TM). A) granulomas hepáticos em torno de resto de ovo, envolto por intenso emaranhado de fibras colágenas: H.E. (100X), B) Intensa reação granulomatosa na lâmina própria da mucosa intestinal e na região da camada serosa: H.E. (100X).

Com relação aos animais do grupo controle, o tratamento com o praziquantel foi eficiente, apresentando uma nítida preservação da mucosa intestinal desses animais, e granulomas em fase de resolução no tecido hepático, os quais representam um estágio de involução do granuloma com alta densidade de colágeno (FIGURA 21).

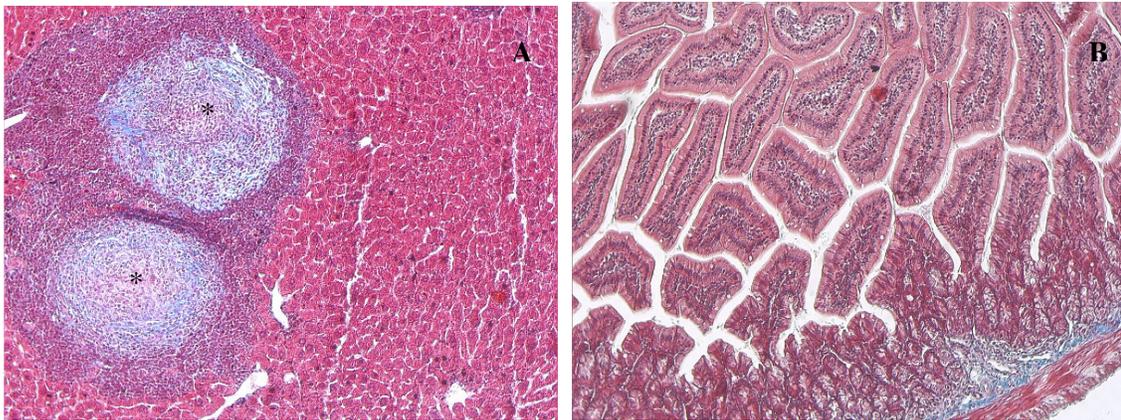


FIGURA 21: Fotomicrografias de fígado e intestino de camundongos tratados com praziquantel - 250 mg/kg (PZQ 3). A) Granulomas hepáticos em fase de resolução (*): T.M. (100X), B) Mucosa intestinal preservada: T.M. (100X).

Conforme os resultados do primeiro experimento, os resultados histopatológicos da associação do praziquantel com testosterona foi semelhante aos do tratamento com praziquantel. No tecido hepático de animais do grupo PZQ 3 + TM foram observados granuloma hepáticos ao redor de ovos e granulomas em fase de resolução, porém a mucosa intestinal se encontrava preservada (FIGURA 22). Esses resultados não podem indicar potenciação do efeito protetor do praziquantel pela testosterona.

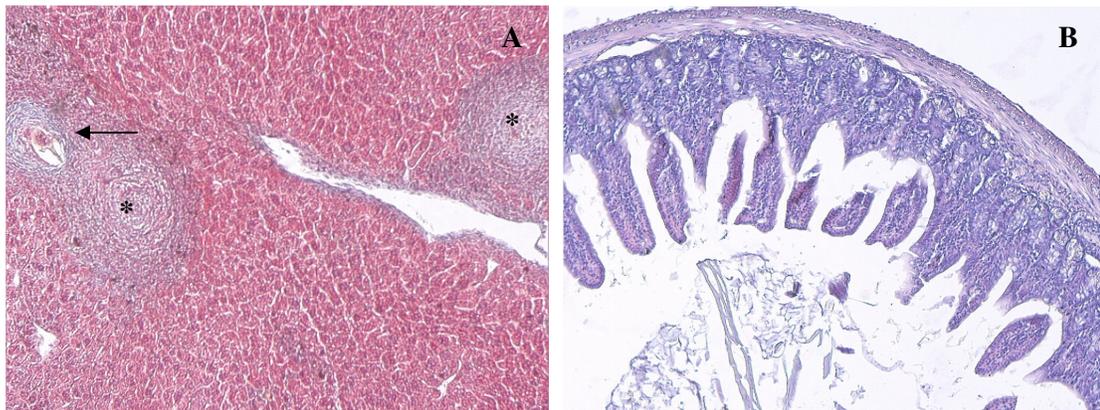


FIGURA 22: Fotomicrografias de fígado e intestino de camundongos tratados com praziquantel - 250 mg/kg e testosterona - 350µg/camundongo (PZQ 3 + TM). A) Granuloma hepático ao redor de ovo (←) e granuloma em fase de resolução (*): T.M. (100X). B) Mucosa intestinal preservada: H.E. (100X).

Conforme citado anteriormente, a testosterona parece não afetar a oviposição das fêmeas de *S. mansoni*, pois camundongos infectados e tratados com esse hormônio não apresentaram alterações no número de ovos hepáticos, quando comparados ao controle (NAKASAWA et al, 1997). O mesmo foi observado após tratamento com DHEA (FALLON et al, 1998) e dexametasona (HERMETO et al, 1994; PYRRHO et al, 2002).

Portanto, os resultados descritos neste estudo concluíram que o tratamento com testosterona reduz a carga parasitária, confirmando os dados da literatura, porém não altera a viabilidade de ovos, a contagem de ovos nas fezes e os aspectos histopatológicos nos tecidos hepático e intestinal dos hospedeiros. A associação entre testosterona e praziquantel aumenta a ação esquistossomicida do último, indicando que o tratamento combinado com testosterona pode melhorar a eficácia do praziquantel.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEBE, F.; GAARDER, P.I.; PETROS, B.; GUNDERSEN, S.G.. Age- and sex-related differences in antibody responses against *Schistosoma mansoni* soluble egg antigen in a cohort of school children in Ethiopia. **Apmis**, v.109, p.816–824, 2001.

ABEBE, F.; BIRKELAND, K.I.; GAARDER, P.I.; PETROS, B.; GUNDERSEN, S.G.. The relationships between dehydroepiandrosterone sulphate (DHEAS), the intensity of *Schistosoma mansoni* infection and parasite-specific antibody responses. **APMIS**, v.111, p.319-328, 2003.

ANDREWS, P.; THOMAS, H.; POHLKE, R.; SEUBERT, J.. Praziquantel. **Medicinal Research Reviews**, v. 3, p. 147-200, 1983.

ARAÚJO, M.I.; RIBEIRO DE JESUS, A.R.; BACELLAR, O.; SABIN, E.; PEARCE, E.; CARVALHO, E.M.. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. **European Journal of Immunology**, v. 26, p. 1399-1403, 1996.

BAULIEU, E.E.. Dehydroepiandrosterone (DHEA): a fountain of youth. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.81, p.3147-3151, 1996.

BARBOSA, C.S.; DOMINGUES, A.L.C.; ABATH, F.; MONTENEGRO, S.M.L.; GUIDA, U.; CARNEIRO, J.. Epidemia de esquistossomose aguda na praia de Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.17, p.725-8, 2001.

BARBOSA, C.S.; FAVRE, T.C.; WANDERLEY, T.N.; CALLOU, A.C.; PIERI, O.S.. Assessment of schistosomiasis, through school surveys, in the Forest Zone of Pernambuco, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.101, s.I, p.55-62, 2006.

BARNA, M.; KOMATSU, T.; BI, Z.; REISS, C.S.. Sex differences in susceptibility to viral infection of the central nervous system. **Journal of Neuroimmunology**, v.67, p.31–39, 1996.

BARRAT, F.; LESOURD, B.; BOULOUIS, H.J.; THIBAUT, D.; VINCENT-NAULLEAU, S.; GJATA, B.; LOUISE, A.; NEWAY, T.; PILET, C.. Sex and parity modulate cytokine production during murine ageing. **Clinical and Experimental Immunology**, v.109, p.562–568, 1997.

BARSOUM R.. The changing face of schistosomal glomerulopathy. **Kidney International**, n.66, p. 2472–84, 2004.

BERGQUIST, N. R.. Schistosomiasis: from risk assessment to control. **Trends of Parasitology**, v. 18, p. 309-314, 2002.

BERNE, R.M.; LEVY, M.N.; KOEPPEN, B.M.; STANTON, B.A.. Fisiologia. 5ª Edição. Rio de Janeiro, Elsevier, 2004.

BIJLSMA, J. W.; CUTOLO, M.; MAIS, A. T.; CHIKANZA, I. C.. The neuroendocrine immune basis of rheumatic diseases. **Immunology Today**, v. 20, p. 298–301, 1999.

BOISSIER, J.; CHLICHIA, K.; DIGON, Y.; RUPPEL, A.; MONE, H.. Preliminary study on sex-related inflammatory reactions in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, v.91, p.144–150, 2003.

BOTTIEAU E.; CLERINX J.; DE VEGA M.R.; VAN DEN ENDEN E.; COLEBUNDERS R.; VAN ESBROECK M.; VERVOORT T.; VAN GOMPEL A.; VAN DEN ENDE J.. Imported Katayama fever: clinical and biological features at presentation and during treatment. **Journal of Infection**, n.52, p.339–45, 2006.

BOULANGER, D.; WARTER, A.; SELLIN, B.; LINDNER, V.; PIERCE, R.J.; CHIPPAUX, J.P.; CAPRON, A.. Vaccine potential of a recombinant glutathione S-transferase cloned from *Schistosoma haematobium* in primates experimentally infected with an homologous challenge. **Vaccine**, v. 19, p. 319-326, 1999.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Esquistossomose Mansônica. **Guia Brasileiro de Vigilância Epidemiológica**, c. 5.10, 5ª Edição, 1998.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Portal da Saúde**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/svs/visualizar_texto.cfm?idtxt=22069. Acesso em 05/10/2007

CARMO, E.H.. Morbidade e mortalidade por esquistossomose mansônica na Região Nordeste do Brasil [**Tese de Doutorado**]. Salvador: Instituto de Saúde Coletiva, Universidade Federal da Bahia; 1999.

CHEEVER, A. W.; YAP, G. S.. Immunologic basis of disease and disease regulation in schistosomiasis. **Chemical Immunology**, v. 66, p. 159–176, 1997.

CHEEVER A.W.; HOFFMANN K.F.; WYNN T.A.. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunology Today**, n.21, p.465–66, 2000.

CHIARAMONTE, M.G.; DONALDSON, D.D.; CHEEVER, A.W.; WYNN, T.A.. An IL-13 inhibitor blocks the development of hepatic fibrosis during a T-helper type-2-dominated inflammatory response. **Journal of Clinical Investigation**, v. 104, p. 777-785, 1999.

CHITZULO, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, v. 77, s. 1, p. 41-51, 2000.

CHUNG, B.; MATTESON, K.J.; VOUTILAINEN, R.; MOHANDAS, T.K.; MILLER, W.L.. Human cholesterol side-chain cleavage enzyme P450 scc : cDNA cloning, assignment of the gene to chromosome 15 and expression in the placenta. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, v.83, p.8962-8966, 1986.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.. Antischistosomal drugs: past, present... and future? **Pharmacology Therapy**, v.68, n. 1, p. 35-85, 1995.

COKER, C.M. Effect of cortisone on natural immunity to *Schistosoma mansoni* in mice. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.96, p.1-3, 1957.

COURA, J.R.. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias** 1ª ed. São Paulo, Guanabara Koogan, 2005.

D'AGOSTINO, P.; MILANO, S.; BARBERA, C.; DI BELLA, G.; LA ROSA, M.; FERLAZZO, V.; FARRUGGIO, R.; MICELI, D.M.; MIELE, M.; CASTAGNETTA, L.; CILLARI, E.. Sex hormones modulate inflammatory mediators produced by macrophages. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.876, p.426–429, 1999.

DA SILVA, J.A.. Sex hormones, glucocorticoids and autoimmunity: facts and hypotheses. **Annals of Rheumatology Diseases**, v.54, p.6–16, 1995.

DANENBERG, H.D.; BEN-YEHUDA, A.; ZAKAY-RONES, Z.; CROSS, D.J.; FRIEDMAN, G.. Dehydroepiandrosterona treatment is not beneficial to the murine response to

influenza in elderly subjects. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. v.82, p.2911-2914, 1997.

DEGU, G.; MENGISTU, G.; JONES, J.. Some factors affecting prevalence of and immune responses to *Schistosoma mansoni* in schoolchildren in Gorgora, northwest Ethiopia. **Ethiopia Medicine Journal**, v.40, p.345–352, 2002.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.. Endogenous blood levels of corticosterone control the immunologic cell mass and B cell activity in mice. **Journal of Immunology**, v.133, p.572–575, 1984.

DESSEIN A.J.; HILLAIRE D.; ELWALI N.E.; MARQUET, S.; MOHAMED-ALI, Q.; MIRGHANI, A.; HENRY, S.; ABDELHAMEED, A.; SAEED, O. K.; MAGZOUB, M.M.; ABEL, L.. Severe hepatic fibrosis in *Schistosoma mansoni* infection is controlled by a major locus that is closely linked to the interferon-gamma receptor gene. **The American Journal Human Genetics**, v.65, p.709–21, 1999.

DIODATO, M.D.; KNOFERL, M.W.; SCHWACHA, M.G.; BLAND, K.I.; CHAUDRY, I.H.. Gender differences in the inflammatory response and survival following haemorrhage and subsequent sepsis. **Cytokine**, v.14, p.162–169, 2001.

DOENHOFF, M.J.; BICKLE, Q.; LONG, E.; BAIN, J.; MCGREGOR, A.. Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. **Journal of Helminthology**, n.52, p.173-186, 1978.

DORNAS, W.C.; NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, T.T.. Considerações sobre os efeitos do uso de esteróides anabólicos androgênicos. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.87, s.1, p.3-8, 2006.

DU, J.T.; VENNOS, E.; RAMEY, E.; RAMWELL, P.W.. Sex differences in arachidonate cyclo-oxygenase products in elicited rat peritoneal macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.794, p.256–260, 1984.

DUVALL, R. H.; DEWITT, W. B. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 16, p. 483-483, 1967.

ELOI-SANTOS, S.; OLSEN, N.J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COLLEY, D.G.. *Schistosoma mansoni*: mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. **Experimental Parasitology**, v.75, p.168–175, 1992.

ENGELS, D.; NAHIMANA, S.; GRYSSELS, B.. Comparison of the direct faecal smear and two thick smear techniques for the diagnosis of intestinal parasitic infections. **Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.90, p.523–25, 1996.

ESCOBEDO, G.; ROBERTS, C.W.; CARRERO, J.C.; MORALES-MONTOR, J.. Parasite regulation by host hormones: na old mechanism of host exploitation? **Trends in Parasitology**, v.21, n.12, p.588-593, 2005.

FALLON, P.G.; DOENHOFF, M.J.. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to the praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.51, s.1, p.83-88, 1994.

FALLON, P.G.; MUBARAK, J.S.; FOOKES, R.E.; NIANG, M.; BUTTERWORTH, A.E.; STURROCKR.F.; DOENHOFFM.J.. *Schistosoma mansoni*: maturation rate and drug susceptibility of different geographic isolates. **Experimental Parasitology**, v.86, s.1, p. 29-36, 1997.

FALLON, P. G.; RICHARDSON, E. J.; JONES, F. M.; DUNNE, D. W.. Dehydroepiandrosterone sulfate treatment of mice modulates infection with *Schistosoma mansoni*. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 5, n. 2, p. 251-253, 1998.

FANTAPPIÉ, M.R.; GALINA, A.; MENDONÇA, R.L.; FURTADO, D.R.; SECOR, W.E.; COLLEY, D.G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; FREEMAN JR, G.; TEMPONE, A.J.; CAMARGO, L.L.; RUMJANEK, F.D.. Molecular characterization of a NADH ubiquinone oxidoreductase subunit 5 from *Schistosoma mansoni* and inhibition of mitochondrial respiratory chain function by testosterone. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 202, p. 149-158, 1999.

FARID, Z.; MANSOUR, N.; KAMAL, K.; GIRGIS, N.; WOODY, J.; KAMAL, M.. The diagnosis and treatment of acute toxæmic schistosomiasis in children. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.81, p.959, 1987.

- FELDMEIER, H.; POGGENSEE, G.. Diagnostic techniques in schistosomiasis control: a review. **Acta Tropica**, v.52, p.205–20, 1993.
- FENWICK, A.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D.; BERGQUIST, N.R.; TOOD, M.H. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends of Parasitology**, v. 19, n. 11, p.509-515, 2003.
- FERRARI, T.C.. Involvement of central nervous system in the schistosomiasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.99, s.1, p.59–62, 2004.
- FETTERER, R.H.; PAX, R.A.; BENNET, J.L.. Praziquantel, potassium and 2,4-dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*. *European Journal of Pharmacology*, n.64, p. 31-38, 1980.
- FLORES-VILLANUEVA, P.O.; ZHENG, X.X.; STROM, T.B.; STADECKER, M. J.. Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. **Journal of Immunology**, v. 156, p. 3315-3320, 1996.
- GELFAND, V.; CLARKE, V.; BERNBERG, H.. The use of steroids in the earlier hypersensitivity stage of schistosomiasis. **Central African Journal of Medicine**, v.27, p.219-221, 1981.
- GREENBERG, R.M.. Ca²⁺ signaling, voltage-gated Ca²⁺ channels and praziquantel in flatworm neuromusculature. **Parasitology**, v.131, p. S97-S108, 2005.
- GRYSSELS, B.; NKULIKYINKA, L.; ENGELS, D.. Impact of repeated community-based selective chemotherapy on morbidity due to schistosomiasis mansoni. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.51, s.5, p.634-641, 1994.
- GRYSSELS, B.; DE VLAS, S.J.. Worm burdens in schistosome infections. **Parasitology Today**, v.12, p.115–119, 1996.
- GRYSSELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L.. Human Schistosomiasis. **Lancet**, v. 368, p. 1106-1118, 2006.

GRZYCH, J. M.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.; CAULADA, Z. A.; CASPAR, P.; HEINY, S.; LEWIS, F.; SHER, A.. Egg deposition is the major stimulus for the productions of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **Journal of Immunology**, v. 146, p. 1322-1327, 1991.

HAGAN, P.; APPLETON, C.C.; COLES, G.C.; KUSEL, J.R.; TCHUEM-TCHUENTE, L.A.. Schistosomiasis control: keep taking the tablets. **Trends in Parasitology**, v.20, p.92-97, 2004.

HANDELSMAN, D.J.; LIU, P.Y.. Andropause: invention, prevention, rejuvenation. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v.16, p.39-45, 2005.

HANDELSMAN, D.J.. Androgen action and pharmacologic uses. In: DeGroot LJ, Jameson JL, editors. *Endocrinology*. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, p. 3121-3138, 2005.

HANDELSMAN, D. L.. Testosterone: use, misuse and abuse. **Medical Journal of Australia**, v. 185, n. 8, p. 436-439, 2006.

HARRISON, R.A.; DOENHOFF, M.J.. Retarded development of *Schistosoma mansoni* in immunosuppressed mice. **Parasitology**, v.86, p.429-438, 1983.

HATZ, C. Schistosomiasis: an underestimated problem in industrialised countries? **Journal of Travel Medicine**, v.12, p.1-2, 2005.

HERMETO, M.V.; BICALHO, R.S.; SILVA, R.E.; MELO, A.L.; PEREIRA, L.H.. Oogram studies in mice infected with *Schistosoma mansoni* and treated with dexamethasone. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v.36, n.2, p.99-103, 1994.

HOFFMAN, K.F.; CHEEVER, A.W.; WYNN, T.A.. IL-10 and the dangers of immune polarization: excessive type 1 and 2 cytokine responses induce distinct forms of lethal immunopathology in murine schistosomiasis. **Journal of Immunology**, v.164, p.6406-6416, 2000.

HOFFMANN, K.F.; WYNN, T.A.; DUNNE, D.W.., Cytokine-mediated host responses infections; walking the fine line between immunological control and immunopathology. **Advances in Parasitology**, v. 52, p. 265-307, 2002.

HULL, K.L.; HARVEY, S.. GH as a co-gonadotropin: the relevance of correlative changes in GH secretion and reproductive state. **Journal of Endocrinology**, v.172, n.1, 2002.

ISMAIL, M.; BOTROS, S.; METWALLY, A.; WILLIAN, S.; FARGHALLY, A.; TAO, L.F.; DAY, T.A.; BENNET, J.L.. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 932-935, 1999.

JELINEK, T.; NOTHDURFT, H.D.; LOSCHER, T.. Schistosomiasis in travelers and expatriates. **Journal of Travel Medicine**, v.3, p.160–64, 1996.

JONES, K.J.; ALEXANDER, T.D.; BROWN, T.J.; TANZER, L.. Gonadal steroid enhancement of facial nerve regeneration: role of heat shock protein 70. **Journal of Neurocytology**, v.29, p.341–349, 2000.

KASILIMA, Y.S.; WANGO, E.O.; KIGONDU, C.S.; MUTAYOBA, B.M.; NYINDO, M.. Plasma bioactive LH and testosterone profiles in male New Zealand rabbits experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, v.92, p.165-172, 2004.

KATZ, N.; CHAVES, A.; PELLEGRINO, J.. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in *Schistosomiasis mansoni*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.14, n.6, p.397-400, 1972.

KATZ, N.; DIAS, L. C. S. *Esquistossomose mansoni em parasitologia humana e seus fundamentos gerais*. Editora Atheneu, 1999.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V.. Análise crítica de estimativa do número de portadores da esquistossomose mansoni no Brasil. **Revista da sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 33, n. 3, p.303, 2000.

KATZ, N; ALMEIDA, K.. Esquistossomose, Xistosa, Barriga D'água. **Ciências e Cultura**, v. 55, n. 1, 2003.

KLEIN, S.L.. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. **Parasite immunology**, v.26, p.247-264, 2004.

KOHN, A. B., ANDERSON, P. A. V., ROBERTS-MISTERLY, J.M. & GREENBERG, R.M. Schistosome calcium channel β subunits: unusual modulatory effects and potential role in the action of the antischistosomal drug praziquantel. **Journal of Biological Chemistry**, v.276, p.36873–36876, 2001.

KOHN, A. B., ROBERTS-MISTERLY, J.M., ANDERSON, P. A. V. & GREENBERG, R.M. Creation by mutagenesis of a mammalian Ca^{2+} channel β subunit that confers praziquantel sensitivity to a mammalian Ca^{2+} channel. **International Journal for Parasitology**, v.33, p.1303–1308, 2003.

KRETZER, D.M.. Endocrinology of the Male Reproductive System. Disponível em: <<http://www.endotext.org/male/male1/male1.html>> Acesso em: 27/07/2007

LAGRANGE, E. À la recherche de stéroïdes de synthèse à action antibilharzienne. **Comptes Rendus dès Séances de la Société de Biologie**, v.157, p.425-427, 1963.

LAMBERTUCCI, J.R.; MODHA, J.; CURTIS, R.; DOENHOFF, M.. The association of steroids and schistosomicides in the treatment of experimental schistosomiasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.83, p.354-357, 1989.

LANSOUD-SOUTAKE, J.; LEONARDELLI, J.; TORPIE, G.; CROIX, D.; CAPRON, A.. Role of *Schistosoma mansoni* bilharziasis in male hypogonadism. **Pathologie Biologie**, v.39, s.7, p.681-685, 1991.

LENZI, H.L.; ROSMAN, F.C.; LENZI, J.A.. Glicocorticóides interferem no mecanismo de eliminação de ovos de *Schistosoma mansoni* em camundongos. In: **Congresso Brasileiro de Medicina Tropical**, p.84, Florianópolis, 1989.

LENZI, H. L.; KIMMEL, E.; SCHECHTMAN, H.; PELAJO-MACHADO, M.; VALE, B. S.; PANASCO, M. S.; LENZI, J. A.. Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 32, p. 639–643, 1999.

LIU, Y. H.; QIAN, M.X.; WANG, X.G.; JIA, J.; WANG, Q.N.; JIANG, Y.F.; WANG, R.Q.; YAN, S.W.; CHEN, B.Y.; LI, J.S.; QIU, Z.Y.; SHEN, J.K.. Comparative efficacy of

praziquantel and its optic isomers in experimental therapy of schistosomiasis japonica in rabbits. **Chinese Medical Journal**, v. 99, p. 935-940, 1986.

LIU, J. L.; FONTAINE, J.; CAPRON, A.; GRZYCH, J.M.. Ultrastructural localization of Sm28 GST protective antigen in *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology**, v. 113, p. 377-391, 1996.

MCKAY, L.I.; CIDLOWSKI, J.A.. Molecular control of immune/ inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. **Endocrine Reviews**, v.20, p.435–459, 1999.

MEHLHORN, H.; BECKER, B.; ANDREWS, P.; THOMAS, H.; FRENKEL, J.K.. *In vivo* and *in vitro* experiments on the effects of praziquantel on *Schistosoma mansoni*. A light and electron microscopic study. **Arzneimittel-Forschung**, v.31, p.544-554, 1981.

MICHALANY, J. **Técnicas histológicas em anatomia patológica com instruções para o cirurgião, enfermeiro e citotécnico**. São Paulo: EPU, p. 277, 1980.

MULLER, L.; HUNT, J.S.. Sex steroid hormones and macrophage function. **Life Sciences**, v.59, p.1–14, 1996.

MULLER, L.; HUNT, J.S.. Regulation of TNF-alpha production in activated mouse macrophages by progesterone. **Journal of Immunology**, v.160, p.5098–5104, 1998.

MOMEN, M.N.; KHASHAAB, O.Y.; EL-SAFURY. Endocrine profile and semen characteristics in men with bilharzial hepatic fibrosis. **Archives of Andrology**, v.19, s.1, p.41-45, 1987.

MONDAL, S.; RAI, U.. Sexual dimorphism in phagocytic activity of wall lizard's splenic macrophages and its control by sex steroids. *General and Comparative Endocrinology*, v.116, p.291–298, 1999.

MOORE, S.L.; WILSON, K.. Parasites as a viability cost of sexual selection in natural populations of mammals. **Science**, v.297, n.5589, p.2015–2018, 2002.

MORALES-MONTOR, J.; NEWHOUSE, E.; MOHAMED, F.; BAGHDADI, A.; DAMIAN, T.R.. Altered levels of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones in baboons and

mice during the course of infection with *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Infectious Diseases**, v.183, p.313-320, 2001.

MORALES-MONTOR, J.; MOHAMED, F.; GHALEB, A. M.; BAIQ, S.; HALLAL-CALLEROS, C.; DAMIAN, R. T.. In vitro effects of hypothalamic-pituitary-adrenal axis (HPA) hormones on *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**, v. 87, p. 1132-1139, 2001.

MOSMANN, T.R.; SCHUMACHER, J.H.; FIORENTINO, D.F.; LEVERAH, J.; MOORE, K.W.; BOND, M. W.. Isolation of monoclonal antibodies specific for IL-4, IL-5, IL-6 and a new Th2-specific cytokine (IL-10), cytokine synthesis inhibitory factor, by using a solid phase radioimmunoassay. **Journal of Immunology**, v. 145, p. 2938-2945, 1990.

MWATHA, J.K.; KIMANI, G.; KAMAU, T.; MBUQUA, G.G.; OUMA, J.H.; MUMO, J.; FURFOLD, A.G.; JONES, F.M.; BUTTERWORTH, A.E.; ROBERTS, M.B.; DUNNE, D.W.. High levels of TNF, soluble TNF receptors, soluble ICAM-1, and IFN-gamma, but low levels of IL-5, are associated with hepatosplenic disease in human schistosomiasis mansoni. **Journal of Immunology**, v.160, p.1992– 1999, 1998.

NAKASAWA, M.; FANTAPPIE, M.R.; FREEMAN JR, G.L.; ELOI-SANTOS, S.; OLSEN, N.J.; KOVACS, W.J.; SECOR, W.E.; COLLEY, D.G.. *Schistosoma mansoni*: susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection. **Experimental Parasitology**, v.85, p.233–240, 1997.

NAUS, C.W.; BOOTH, M.; JONES, F.M.; KEMIJUMBI, J.; VENNERVALD, B.J.; KARIUKI, C.H.; OUMA, J.H.; KABATEREINE, N.B.; DUNNE, D.W.. The relationship between age, sex, egg-count and specific antibody responses against *Schistosoma mansoni* antigens in a Ugandan fishing community. **Tropical Medicine & International Health**, v.8, p.561–568, 2003.

NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARD, P.M. **Parasitologia Humana**, c. 22, p. 174-193, Editora Atheneu, 10^a Edição, 2000.

NEWSOME, J.. Observations on corticosteroid treatment os schistosomiasis in hamsters and baboons. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.57, p.425-432, 1963.

OLDS G. R.; DASARATHY S.. Schistosomiasis. **Currents Treatment Options to Infect Diseases**, n.2, p.88–99, 2000.

OLIVIER, L.; STIREWALT, M.A. An efficient method for exposure of mice to cercarie of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Parasitology**, v. 38, p. 19-23, 1952.

OWENS, I.P.. Ecology and evolution. Sex differences in mortality rate. **Science**, v.297, n.5589, p.2008–2009, 2002.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S.. The immunobiology of schistosomiasis. **Nature Reviews**, v. 2, p. 499-511, 2002.

PELLEGRINO, J.; FARIA, J.. The oogram method for the screening of drugs in schistosomiasis mansoni. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.14, p.363-369, 1965.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N.. Experimental chemotherapy of schistosomiasis. IV. Oogram studies with nicarbazin, an egg-suppressive agent. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.11, n.3, p.215-221, 1969.

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

POGGENSEE, G.; FELDMEIERS, H.. Female genital schistosomiasis: fact and hypotheses. **Acta Tropica**, v.79, p.193–210, 2001.

POLLACK, S.E.; FURTH, E.E.; KALLEN, C.B.; ARAKANE, F.; KIRIAKIDOU, M.; KOZARSKI, K.F.; STRAUSS, J.F.. Localization of the steroidogenic acute regulatory protein in human tissues. **The Journal of Clinical of Endocrinology and Metabolism**, v.82, p.4243-4251, 1997.

PYRRHO, A.S.; RAMOS, J.A.; MOURA NETO, R.; SILVA, C.S.; LENZI, H.L., TAKIYA, C.M.; GATTASS, C.R.. Dexamethasone, a drug for attenuation of *Schistosoma mansoni* infection morbidity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.46, n.11, p.3490-3498, 2002.

RASMUSSEN, K. R.; HEALEY, M. C.; CHENG, L.; YANG S.. Effects of dehydroepiandrosterone in immunosupressed adult mice infected with *Cryptosporidium parvum*. **Journal of Parasitology**, v. 81, n. 3, p. 429-433, 1995.

REMOUE, F.; TO VAN, D.; SCHACHT, A.M.; PIQUET, M.; GARRAUD, O.; VERCRUYSSSE, J.; LY, A.; CAPRON, A.; RIVEAU, G.. Gender-dependent specific immune response during chronic human Schistosomiasis haematobia. **Clinical and Experimental Immunology**, v.124, p.62–68, 2001.

REMOUE, F.; MANI, J.C.; PUGNIÈRE, M.; SCHACHT, A.M.; CAPRO, A.; RIVEAU, G.. Functional specific binding of testosterone to *Schistosoma haematobium* 28-kilodalton glutathione S-transferase. **Infection and Immunity**, v.70, p. 601-605, 2002.

RESENDES, A.P.C.; SANTOS, R.S.; BARBOSA, C.S.. Internação hospitalar e mortalidade por esquistossomose mansônica no Estado de Pernambuco, Brasil, 1992/2000. **Caderno de Saúde Pública**. v.21, s.5, p. 1392-1401, 2005.

REY, L. **Parasitologia Médica**, c. 31-35, p. 342-477, Editora Guanabara Koogan, 2ª Edição, 2001.

RIBEIRO DE JESUS, A.; SILVA, A.; SANTANA, L. B.; MAGALHÃES, A.; DE JESUS, A.A.; ALMEIDA, R.P.; RÊGO, M.A.; BURATTINI, M.N.; PEARCE, E.J.; CARVALHO, E.M... Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute *Schistosomiasis mansoni*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 185, p. 98-105, 2002.

ROBERTS, C.W.; WALKER, W.; ALEXANDER J.. Sex-associated hormones and immunity to protozoan parasites. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, s.3, p.476–488, 2001.

ROCA, C.; BALANZO, X.; GASCON, J.; FERNANDEZ-ROURE, J.L.; VINUESA, T.; VALLS, M.E.; SAUCA, G.; CORACHAN, M.. Comparative clinico-epidemiologic study of *Schistosoma mansoni* infections in travellers and immigrants in Spain. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.21, p. 219-223, 2002.

RODRIGUES, J.A.; FAVARETTO, A.L.V.. Sistema Reprodutor. In: AIRES, M.M.. Fisiologia. 2ª Edição, Editora Guanabara Koogan, 1999.

ROSS A.G.; BARTLEY P.B.; SLEIGH A.C.; OLDS G. R.; LI W.; WILLIAMS G.M.; MCMANUS D. P.. Schistosomiasis. **The New England Journal of Medicine**, v.346, p.1212–20, 2002.

ROY, A.K.; LAVROVSKY, Y.; SONG, C.S.; CHEN, S.; JUNG, M.H.; VELU, N.K.; BI, B.Y.; CHATTERJEE, B.. Regulation of androgen activity. **Vitamins and Hormones**, v.55, p.309, 1999.

RUFFER, M. A.. Note on the presence of “Bilharzia Haematobia” in Egyptian mummies of the twentieth dynasty. **British Medical Journal**, i.16, 1910.

SAAD, A.H.; ABDELBAKY, A.; OSMAN, A.M.; ABDALLAH, K.F.; SALEM, D.. Possible role of *Schistosoma mansoni* infection in male hypogonadism. **Journal of the Egyptian Society of Parasitology**, v.29, s.2, p.307-323, 1999.

SABAH, A.A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; DOENHOFF, M.. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. **Experimental Parasitology**, v.61, p.294-303, 1986.

SANTOS, G.R.; ALMEIDA, S.V.; LEITE, L.C.C.. Schistosomiasis – a century searching for chemotherapeutic drugs. **Parasitology Research**, v. 99, s.5, p. 505-521, 2006.

SARVEL, A. K.; KUSEL, J. R.; ARAÚJO, N.; COELHO, P. M. Z.; KATZ, N.. Comparison between morphological and staining characteristics of live and dead eggs of *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, s. II, p. 289-292, 2006.

SAVITA, X.X.; RAI, U.. Sex steroid hormones modulate the activation of murine peritoneal macrophages: receptor mediated modulation. **Comparative Biochemistry and Physiology C Pharmacology, Toxicology & Endocrinology**, v.119, p.199–204, 1998.

SCIENCE PHOTO LIBRARY. Disponível em: <http://www.sciencephoto.com> Acesso em 23/07/2007.

SCHUURS, A.H.; VERHEUL, H.A.. Effects of gender and sex steroids on the immune response. **Journal of Steroid Biochemistry**, v.35, p.157–172, 1990.

SCHIFF, C.J.; CMELIK, S.H.; LEY, H.E. KRIEL, R.L.. The influence of human skin lipids on the cercarial penetration responses of *Schistosoma haematobium* and *Schistosoma mansoni*. **Journal of Parasitology**, v.58, p.476–480, 1972.

SHER, A.; FIORENTINO, D.; CASPAR, P.; PEARCE, E.; MOSMANN, T.. Production of IL-10 by CD4 T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. **Journal of Immunology**, v. 147, p. 2713-2716, 1991.

SMYTHIES, L.E.; BETTS, C.; COULSON, P.S.; DOWLING, M.A.; WILSON, R.A.. Kinetics and mechanisms of effector focus formation in the lungs of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunology**, v. 18, p. 359-369, 1996.

SPITZER, J.A.. Gender differences in some host defense mechanisms. **Lupus**, v.8, p.380–383, 1999.

SORACHI, K.; KUMAGAI, S.; SUGITA, M.; YODOI, J.; IMURA, H.. Enhancing effect of 17 beta-estradiol on human NK cell activity. **Immunology Letters**, v.36, p.31–35, 1993.

STADECKER, M. J.; HERNANDEZ, H. J.. The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni*: a key role of major egg antigen Sm-p40. **Parasite Immunology**, v. 20, p. 217-211, 1998.

STADECKER, M.J.; ASAHI, H.; FINGER, E.; HERNANDEZ, H. J.; RUTITZKY, L. I.; SUN, J.. The immunobiology of Th1 polarization in high-pathology schistosomiasis. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 168-179, 2004.

STANDEN, D. The effect of temperature, light and salinity upon the hatching of the ova of *Schistosoma mansoni*. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, p. 225-241, 1952.

STAUDT, U.; SCHMAHL, G.; BLASCHKE, G.; MEHLHORN, H.. Light and scanning electron microscopy studies on the effects of the enantiomers of praziquantel and its main metabolite on *Schistosoma mansoni in vitro*. **Parasitology Research**, v. 78, p. 392-397, 1992.

STELMA F.F.; TALLA I.; SOW S.; KONGS A.; NIANG M.; POLMAN K.; DEELDER A.M.; GRYSSELS B.. Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of

Schistosoma mansoni. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.53, p.167–70, 1995.

STTOCO, D.M.. StAR protein and the regulation of the steroid hormone, biosynthesis. **Annual Review of Physiology**, v.63, p.193, 2001.

TANAKA, M.; OHMAE, H.; UTSUNOMITA, H.; NARA, T.; IRIE, Y.; YASURAOKA, K.. A comparasion of the antischistosomal effect of levo-and dextro-praziquantel on *Schistosoma japonicum* and *Schistosoma mansoni* in mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 41, p. 198-203, 1989.

TDR – SPECIAL PROGRAM FOR RESEARCH AND TRAINING IN TROPICAL DISEASES. Strategic Direction for Research. Disponível em <<http://www.who.tdr.diseases/schisto/default.htm>> Acesso em 04/11/2004

VEGETO, E.; POLLIO, G.; PELLICCIARI, C.; MAGGI, A.. Estrogen and progesterone induction of survival of monoblastoid cells undergoing TNF-alpha-induced apoptosis. **The FASEB Journal**, v.13, p.793–803, 1999.

WEINER, F.R.; CZAJA, M.J.; GIAMBRONE, M.A.; TAKAHASHI, S.; BIEMPICA, L.; ZERN, M.A.. Transcriptional and pos-transcriptional effects of dexametasona on albumina and procollagen messenger RNAs in murine schistosomiasis. **Biochemistry**, v.26, p.1557-1562, 1987.

WEINSTEIN, Y.; RAN, S.; SEGAL, S.. Sex-associated differences in the regulation of immune responses controlled by the MHC of the mouse. **Journal of Immunology**, v.132, p.656–661, 1984.

WHO. Schistosomiasis and soil-transmitted helminth infections-preliminary estimates of the number of children treated with albendazole or mebendazole. **Weekly Epidemiological Record**, n.81, p.145-164, Geneva, 2006.

WILSON, J.D.. Androgens, androgen receptors and male gender role behaviour. **Hormones and Behavior**, v.40, p.358, 2001.

WU, M.H.; WEI, C.C.; XU, Z.; YUAN, H.C.; LIAN, W.N.; YANG, Q.J.; CHEN, M.; JIANG, Q.W.; WANG, C.Z.; ZHANG, S.J.. Comparasion of the therapeutic efficacy and side

effects of a single dose of levo- praziquantel with mixed isomer praziquantel in 278 cases of schistosomiasis japonica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.45, p. 345-349, 1991.

WUNDERLICH, F.; BENTEN, W.P.; LIEBERHERR, M.; GUO, Z.; STAMM, O.; WREHLKE, C.; SEKERIS, C.E.; MOSSMANN, H.. Testosterone signaling in T cells and macrophages. **Steroids**, v. 67, p. 535– 538, 2002.

WYNN, T. A.; ELTOUM, I.; CHEEVER, A. W.; LEWIS, F. A.; GAUSE, W. C.; SHER, A.. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. **Journal of Immunology**, v. 151, p. 1430-1440, 1993.

YOVEL, G.; SHAKHAR, K.; BEN-ELIYAHU, S.. The effects of sex, menstrual cycle, and oral contraceptives on the number and activity of natural killer cells. **Gynecologic Oncology**, v.81, p.254– 262, 2001.

XIAO, S.H.; CATTO, B.A. Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of racemic praziquantel and its levorotated isomer on *Schistosoma mansoni*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 159, p. 589-592, 1989.

XIAO, S.H.; CHOLET, J.; BOOTH, M.; WEISS, N.A.; TANNER, M. Therapeutic effect of praziquantel enantiomers in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, p. 324-325, 1999.

ZARROW, M. X.; YOCHIN, J. M.; MCCARTHY, J. L.. **Experimental Endocrinology: a Sourcebook of Basic Techniques**, c. 5, p. 128-133. Academic Press, New York and London, 1964.

7. ARTIGO CIENTÍFICO

ASSOCIAÇÃO DE TESTOSTERONA E PRAZIQUANTEL NO TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL

Artigo a ser submetido à Revista Experimental Parasitology
ISSN 0014-4894

ASSOCIAÇÃO DE TESTOSTERONA E PRAZIQUANTEL NO TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI EXPERIMENTAL

Fernanda A. César¹, Maria C.A. Lima¹, Ivan R. Pitta¹, Daniel P. Udrisar², Eliete C. Silva⁴, Paloma L. Medeiros⁴, Mônica C.P.A. Albuquerque³, Maria I. Wanderley², Suely L. Galdino¹

¹Departamento de Antibióticos; ²Departamento de Fisiologia e Farmacologia; ³Departamento de Medicina Tropical; ⁴ Departamento de Histologia e Embriologia. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Avenida Professor Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901.

Os hormônios sexuais, especialmente a testosterona, estão implicados como fatores que controlam o estabelecimento e patogênese da esquistossomose, seja modulando a resposta imune protetora e regulando a infecção por *Schistosoma*, seja afetando a maturação e oviposição do parasita. Com o objetivo de demonstrar que a presença de testosterona no hospedeiro durante infecção por *Schistosoma* está relacionada à menor carga parasitária e alterações patológicas do hospedeiro, o estudo descrito no presente trabalho avaliou os efeitos desse hormônio, associado ou não ao praziquantel no tratamento da esquistossomose experimental. A testosterona promoveu diminuição de carga parasitária e alterações na viabilidade de ovos em tecido intestinal de camundongos suíços fêmeas infectados com *S. mansoni*. No que concerne ao número de ovos liberados nas fezes, o tratamento com testosterona parece não modificar esta função. O tratamento com PZQ promoveu uma maior preservação dos tecidos hepático e intestinal, não havendo uma potenciação desse efeito protetor pela testosterona. Então, os resultados aqui apresentados sugerem que a testosterona apresenta um efeito benéfico no tratamento da esquistossomose mansoni, aumentando a eficácia do praziquantel, fármaco de primeira escolha recomendado pela Organização Mundial de Saúde.

Índice de palavras-chave e abreviaturas: *Schistosoma mansoni*; Esquistossomose; Trematoda; *Biomphalaria glabrata*; Testosterona; *Mus musculus*; Praziquantel (PZQ); Miligrama por Kilograma de peso corporal (mg/kg); Micrograma por camundongo ($\mu\text{g}/\text{camundongo}$); Hematoxilina & Eosina (HE); Tricrômico de Masson (TM).

INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, que afeta aproximadamente 200 milhões de pessoas em todo o mundo (WHO, 2006). Estudos epidemiológicos em diferentes regiões endêmicas demonstram que os padrões de infecção por este gênero são similares (FALLON et al, 1998), havendo uma maior prevalência em crianças (KLEIN, 2004), com um pico de infecção entre os 10 e 14 anos, seguido por um declínio drástico, o qual se inicia no período da puberdade (MORALES-MONTOR et al, 2001).

Os hormônios sexuais, em especial a testosterona, têm sido apontados como um dos fatores que podem influenciar os níveis da infecção parasitária, modulando a resposta imune, e diminuindo a susceptibilidade à infecção com a idade (FULFORD et al, 1998, SKELLY et al, 1994). Existem espécies nas quais as fêmeas são mais susceptíveis à infecção por *S. mansoni*, é o caso de camundongos da espécie *Mus musculus*, onde os machos são resistentes, e as fêmeas apresentam uma maior resposta pró-inflamatória, desenvolvendo a forma mais grave da doença (ELOI-SANTOS et al, 1992). Em adição, camundongos machos castrados exibem um maior nível de infecção, enquanto fêmeas tratadas com testosterona exógena têm uma diminuição de carga parasitária (NAKASAWA et al, 1997).

A principal estratégia atual para o controle da esquistossomose está no tratamento dos indivíduos infectados, o qual consiste na utilização do praziquantel (PZQ) como fármaco de escolha, por ser efetivo contra todas as espécies de interesse médico do gênero *Schistosoma*. Porém sua pouca eficácia sobre as formas imaturas (PICA-MATTOCCIA e CIOLI, 2004) do parasita tem sérias implicações no tratamento da esquistossomose aguda, a qual ainda não possui uma abordagem terapêutica consolidada. Procurando contribuir na resolução desse problema, o uso de esquistossomicidas associados a esteróides tem sido pesquisado experimentalmente, e obtendo resultados satisfatórios, como os encontrados com dexametasona (PYRRHO et al, 2002); cortisona (HARRISON e DOENHOFF, 1983); prednisolona (LAMBERTUCCI et al, 1989); e de-hidroepiandrosterona (FALLON et al, 1998).

Em virtude destes fatos, com o objetivo de demonstrar que a presença de testosterona no hospedeiro durante infecção por *Schistosoma* está relacionada à menor carga parasitária, e pode ter importantes implicações no tratamento da esquistossomose, nós promovemos a administração de testosterona exógena em camundongos *Mus musculus* fêmeas infectados por *S. mansoni*, associada ou não ao praziquantel.

MATERIAL E MÉTODOS

Parasitas e Hospedeiros

Neste estudo foi utilizada a cepa Belo Horizonte (BH) de *Schistosoma mansoni*, mantida pelo Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE). Caramujos *Biomphalaria glabrata* foram usados como hospedeiros intermediários, e camundongos albinos suíços fêmeas *Mus musculus* como definitivos. A manutenção dos hospedeiros foi realizada no LIKA/UFPE.

Testosterona e Praziquantel

O PZQ foi adquirido pela SIGMA ALDRICH CORPORATION (Lote 122K1443). A terapia hormonal foi feita com Testosterone propionate, adquirida pela SIGMA ALDRICH CORPORATION (Lote 11H0995).

Tratamento

Camundongos fêmeas adultas, 30-40g, foram mantidos em Biotério com iluminação e temperatura controladas, e ração e água *ad libitum*. Todos os animais foram infectados por imersão caudal com 80 cercárias de *S. mansoni* (cepa BH), e divididos em grupos: Controle - grupo infectado não tratado, G1 - tratado com Testosterona, G2 - tratado com PZQ, G3 - tratado com PZQ + Testosterona, segundo protocolo realizado por Lambertucci e colaboradores (1989). A testosterona foi administrada em doses fisiológicas de 350 e 700 µg/camundongo, via intraperitoneal em 0,1 mL de óleo de milho, duas vezes por semana, começando 10 dias antes da infecção até uma semana antes da leitura dos resultados, o qual ocorreu aos 70 dias pós-infecção (NAKASAWA et al, 1997). O praziquantel foi administrado por via oral nas doses 250 e 83mg/kg, durante três dias consecutivos após 50 dias de infecção. Os grupos, onde não houve administração de testosterona, receberam o mesmo volume de óleo de milho, e os grupos que não foram tratados com praziquantel receberam água potável. A avaliação foi feita quanto à carga parasitária, contagem de ovos nas fezes, viabilidade de ovos em tecido intestinal e alterações histopatológicas.

Kato-Katz

Os camundongos foram analisados quanto à eliminação de ovos nas fezes, aos 49 dias de infecção, o que correspondeu à análise antes do tratamento; aos 55 dias de infecção, período imediatamente após o término do tratamento; e aos 64 dias de infecção, dia anterior à realização da perfusão do sistema porta. O método de Kato-Katz (KATZ et al, 1972) foi utilizado para analisar as amostras, ele baseia-se na clarificação da amostra fecal por glicerina e água, facilitando a visualização dos ovos, e permite a quantificação da infecção pela contagem dos ovos, usualmente expressas por gramas de fezes (ENGELS et al, 1996).

Carga Parasitária

Todos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e submetidos à perfusão do sistema porta hepático para retirada, contagem e classificação dos vermes, de acordo com o sexo e vitalidade, após 15 dias do término do tratamento (DUVAL e DEWITT, 1967). Posteriormente foram retirados três fragmentos da porção distal do intestino delgado, para análise do oograma, e o fígado e uma porção do intestino, para análise histopatológica.

Oograma

Três fragmentos retirados da porção distal do intestino foram lavados em solução salina e ligeiramente secados em papel absorvente. Posteriormente, os mesmos foram comprimidos entre lâmina e lamínula para realização da leitura (PELLEGRINO e FARIA, 1965). Os fragmentos foram microscopicamente analisados e 300 ovos, por camundongos, contados e classificados de acordo com os seus estádios de desenvolvimento. Os ovos foram classificados em: (i) ovos imaturos viáveis (de 1º a 4º estágio); (ii) ovos maduros viáveis; e, (iii) ovos inviáveis (calcificados, com miracídio retraído, semi-transparentes) (PELLEGRINO e KATZ, 1969).

Análise Histopatológica

O fígado e intestino dos animais, retirados para processamento histopatológico, foram fixados com formol tamponado à 10% e em seguida colocados em álcool a 70%. Após a fixação, foram desidratados em uma bateria crescente de álcoois (80 a 100%), diafanizados

em Xilol e incluídos em parafina; posteriormente foram realizados os cortes histológicos com espessura de 5µm (MICHALANY, 1980). Os cortes foram corados pela técnica de rotina com Hematoxilina & Eosina (HE) e Tricrômico de Masson (TM), sendo em seguida montados entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan®, Merck). Após a montagem, as preparações foram avaliadas com relação à escolha dos cortes representativos para a captura das imagens através de microscópio óptico (LEICA), com câmara digital acoplada a um computador com programa específico para análise de imagem.

Análise dos dados

A análise estatística foi realizada pelo Software Prism GraphPad, versão 3.00 para Windows. O Teste de Dunnett foi usado para comparação entre o grupo controle e os múltiplos grupos experimentais. As diferenças foram consideradas significantes em $P < 0,05$.

RESULTADOS

A associação da testosterona com PZQ no tratamento de camundongos albinos suíços infectados com *Schistosoma mansoni* revelou-se benéfica, melhorando a resposta terapêutica do praziquantel quando utilizado isoladamente. O tratamento com testosterona (G2) promoveu uma redução de 25,90% na carga parasitária (TABELA 1). O praziquantel sozinho (G3) reduziu o número de vermes em 73,05%, porém o sinergismo com a testosterona (G4) aumentou esta redução em 22,75%, perfazendo uma diminuição total de 95,80% no número de vermes.

TABELA 1

O tratamento utilizando apenas testosterona (G2) não alterou a viabilidade dos ovos, sendo encontrado todos os estádios de evolução. Porém, a administração de testosterona associada ao praziquantel (G4) promoveu um aumento no número de ovos inviáveis ($P < 0,001$), com redução dos ovos maduros, quando comparados aos resultados do controle não tratado (FIGURA 1). Estádios jovens de evolução dos ovos (1º e 2º) também foram observados nos grupos tratados com a associação de praziquantel e testosterona (G4), ou apenas com o esquistossomicida (G3), sem diferenças significativas entre eles, indicando recuperação das fêmeas.

FIGURA 1

Com relação ao número de ovos liberados junto com as fezes, o tratamento com testosterona parece não modificar esta característica. Apenas houve uma diminuição da quantidade dos ovos (sem significância) após quatorze dias de tratamento, quando comparados ao controle não tratado (FIGURA 2). A média de ovos por grama de fezes diminuiu consideravelmente nos dois grupos tratados com praziquantel (G3 e G4), porém no G4 não foram encontrados ovos após 14 dias de tratamento com o esquistossomicida ($P < 0,05$).

FIGURA 2

Os animais pertencentes ao G1 apresentaram reação inflamatória granulomatosa típica da patogenia da esquistossomose, com granulomas dispersos pelo parênquima hepático e mucosa intestinal, envoltos por fibras de colágeno (FIGURA 3). O tratamento com testosterona, na dose 700 µg/camundongo (G2), não alterou os resultados histopatológicos, não havendo diferenças morfológicas nos tecidos estudados (fígado e intestino), ou diferenças no aspecto dos granulomas quando comparados ao controle (FIGURA 4).

FIGURA 3

FIGURA 4

Com relação aos animais do grupo controle, o tratamento com o praziquantel (G3) foi eficiente, apresentando uma nítida preservação da mucosa intestinal desses animais, e granulomas em fase de resolução no tecido hepático, os quais representam um estágio de involução do granuloma com alta densidade de colágeno (FIGURA 5).

FIGURA 5

Os resultados histopatológicos da associação do praziquantel com testosterona (G4) foi semelhante aos do tratamento com praziquantel (G3). No tecido hepático de animais do grupo G4 foram observados granuloma hepáticos ao redor de ovos e granulomas em fase de

resolução, porém a mucosa intestinal se encontrava preservada (FIGURA 6). Esses resultados não podem indicar potenciação do efeito protetor do praziquantel pela testosterona.

FIGURA 6

DISCUSSÃO

No estudo aqui descrito nós usamos o modelo experimental para investigar um possível sinergismo entre testosterona e praziquantel no tratamento da esquistossomose mansoni. Nossos resultados apresentaram alterações de carga parasitária e viabilidade dos ovos, onde a testosterona reduziu o número de vermes não apenas quando aplicada junto com a praziquantel, como também sozinha, e promoveu um aumento do número de ovos inviáveis com decréscimo de ovos maduros no grupo tratado com testosterona e praziquantel.

Esses resultados coincidem com os de outros autores, que observaram que a média de número de vermes recuperados de camundongos com altos níveis de testosterona, devido à administração exógena do hormônio, também foi significativamente menor, em relação aos animais com baixos níveis de testosterona devido à castração (NAKASAWA et al,1997). Neste mesmo estudo, os autores deduzem que a testosterona atua no início da infecção, pois quando sua administração iniciou-se após 10 ou mais dias de infecção, a carga parasitária foi semelhante a fêmeas normais, e machos castrados.

Fallon e colaboradores (1998), também obtiveram uma menor carga parasitária após tratamento com DHEA, hormônio esteróide que sofre metabolização à testosterona, e este efeito foi mais pronunciado em animais cujo tratamento começou duas semanas antes da infecção. Estes resultados indicam que o efeito protetor da testosterona parece ocorrer em resposta ao estágio migratório do parasita (esquistossômulo), e não ao verme adulto.

A testosterona parece não afetar a fertilidade, e dessa forma a oviposição, das fêmeas de *S. mansoni*. Estudo realizado com tratamento exógeno de testosterona em camundongos fêmeas e machos castrados, também não apresentou diferenças significativas no número de ovos hepáticos entre os grupos experimentais e o controle (NAKASAWA et al, 1997). O tratamento com DHEA também não afetou a fecundidade das fêmeas (FALLON et al, 1998).

Estudos realizados com administração de dexametasona em camundongos infectados por *S. mansoni*, também não apresentaram alterações na cinética de oviposição do parasita, encontrando quantidades similares de ovos imaturos e maduros nos fragmentos intestinais (HERMETO et al, 1994), comparando-se animais tratados e controle. Todavia, este quadro acarreta um acúmulo de ovos nos tecidos, refletindo redução em sua eliminação, ficando os mesmos retidos no intestino como proposto por Lenzi e colaboradores (1989). Eles

relacionaram este fato à ação indireta dos glicocorticóides sobre os eosinófilos, células que favorecem a passagem dos ovos pelo intestino, bloqueando sua eliminação pelas fezes.

Doenhoff e colaboradores (1978) também observaram um bloqueio parcial na excreção de ovos, onde o número de ovos produzidos pelos vermes continua o mesmo, porém ocorrem alterações na eliminação dos mesmos junto com as fezes, quando estudaram o desenvolvimento da infecção por *S. mansoni* em animais imunossuprimidos, por tratamento com esteróides.

A inflamação granulomatosa em esquistossomose é uma reação de hipersensibilidade mediada por células a antígenos de ovos do parasita, que estão alojados no tecido hepático (REY et al, 2001). Os granulomas são compostos por uma área de necrose envolta por macrófagos, eosinófilos e linfócitos, havendo com o tempo, o aparecimento de uma área de cura com depósito de fibras de colágeno, um processo que leva a fibrose tecidual (LENZI et al, 1999). Na fase crônica da infecção, o alto número de granulomas e sua confluência pode induzir a hipertensão portal, sangramento gastrointestinal, e eventualmente, a morte (CHEEVER e YAP, 1997).

O aparecimento de granulomas nos órgãos de camundongos tratados com praziquantel e/ou testosterona, está de acordo com os resultados do oograma, onde não houve alteração na fecundidade dos vermes, sendo observados todos os estádios de evolução dos ovos após tratamento. A explicação pode estar no fato do tratamento alterar a distribuição dos ovos nos tecidos, reduzindo a excreção dos mesmos pelas fezes, e favorecendo a deposição dos mesmos no intestino ao invés do fígado (PYRRHO et al, 2002).

Conforme citado anteriormente, a testosterona parece não afetar a oviposição das fêmeas de *S. mansoni*, pois camundongos infectados e tratados com esse hormônio não apresentaram alterações no número de ovos hepáticos, quando comparados ao controle (NAKASAWA et al, 1997). O mesmo foi observado após tratamento com DHEA (FALLON et al, 1998) e dexametasona (HERMETO et al, 1994; PYRRHO et al, 2002).

O tratamento de camundongos com glicocorticóides mostrou significativa redução no tamanho e área dos granulomas (PYRRHO et al, 2002). Essa redução nas medidas dos granulomas hepáticos poderia ser benéfica para o hospedeiro, conforme relato de Fanning e colaboradores (1981), onde camundongos infectados com *S. mansoni* apresentaram uma diminuição em tamanho do granuloma diretamente proporcional às reduções na média de hipertensão portal e morbidade.

Os resultados apresentados neste trabalho concluem que a testosterona foi eficaz no tratamento da esquistossomose mansoni, melhorando a ação esquistossomicida do

praziquantel, por reduzir a carga parasitária e aumentar a inviabilidade dos ovos de *S. mansoni*, independente de estar associado ao praziquantel. Entretanto, a liberação de ovos nas fezes e os achados histopatológicos não foram alterados pela terapia hormonal. O mecanismo pelo qual a testosterona age ainda não está definido.

AGRADECIMENTOS

Parte deste trabalho foi apoiada pelo FINEP Grant Ref. 1455/03, Edital 01/2003. F. A. C. foi apoiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES). A manutenção da cepa de Belo Horizonte de *S. mansoni* foi realizada pela técnica Aline Cândido.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEEVER, A. W., YAP, G. S. 1997. Immunologic basis of disease and disease regulation in schistosomiasis. *Chemical Immunology*, 66, 159–176.
- DOENHOFF, M.J., BICKLE, Q., LONG, E., BAIN, J., MCGREGOR, A. 1978. Factors affecting the acquisition of resistance against *Schistosoma mansoni* in the mouse. *Journal of Helminthology*, 52, 173-186.
- DUVALL, R. H., DEWITT, W. B. 1967. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 16, 483-483.
- ELOI-SANTOS, S., OLSEN, N.J., CORREA-OLIVEIRA, R., COLLEY, D.G. 1992. *Schistosoma mansoni*: mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. *Experimental Parasitology*, 75, 168–175.
- ENGELS, D., NAHIMANA, S., GRYSSELS, B. 1996. Comparison of the direct faecal smear and two thick smear techniques for the diagnosis of intestinal parasitic infections. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 90, 523–25.

- FALLON, P. G., RICHARDSON, E. J., JONES, F. M., DUNNE, D. W. 1998. Dehydroepiandrosterone sulfate treatment of mice modulates infection with *Schistosoma mansoni*. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 5, 251-253.
- FANNING, M. M., PETERS, P. A., DAVIS, R. S., KAZURA, J. W., MAHMOUD, A. A. 1981. Immunopathology of murine infection with *Schistosoma mansoni*: relationship of genetic background to hepatosplenic disease and modulation. *Journal of Infectious Diseases*, 144, 148–153, 1981.
- FULFORD, A.J.C., WEBSTER, M., OUMA, J.H., KIMANI, G., DUNNE, D.W. 1998. Puberty and age-related changes in susceptibility to Schistosome infection. *Parasitology Today*, 14, 23-26, 1998.
- HARRISON, R.A., DOENHOFF, M.J. 1983. Retarded development of *Schistosoma mansoni* in immunosuppressed mice. *Parasitology*, 86, 429-438.
- HERMETO, M.V., BICALHO, R.S., SILVA, R.E., MELO, A.L., PEREIRA, L.H. 1994. Oogram studies in mice infected with *Schistosoma mansoni* and treated with dexamethasone. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, 36, 99-103.
- 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.
- KLEIN, S.L. 2004. Hormonal and immunological mechanisms mediating sex differences in parasite infection. *Parasite immunology*, 26, 247-264.
- LAMBERTUCCI, J.R., MODHA, J., CURTIS, R., DOENHOFF, M. 1989. The association of steroids and schistosomicides in the treatment of experimental schistosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83, 354-357.
- LENZI, H. L., KIMMEL, E., SCHECHTMAN, H., PELAJO-MACHADO, M., VALE, B. S., PANASCO, M. S., LENZI, J. A. 1999. Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*: dependence on fiber radiation centers. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 32, 639–643.

MICHALANY, J. 1980. Técnicas histológicas em anatomia patológica com instruções para o cirurgião, enfermeiro e citotécnico. São Paulo: EPU, 277.

MORALES-MONTOR, J., NEWHOUSE, E., MOHAMED, F., BAGHDADI, A., DAMIAN, T.R. 2001. Altered levels of hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones in baboons and mice during the course of infection with *Schistosoma mansoni*. The Journal of Infectious Diseases, 183, 313-320.

NAKASAWA, M., FANTAPPIE, M.R., FREEMAN JR, G.L., ELOI-SANTOS, S., OLSEN, N.J., KOVACS, W.J., SECOR, W.E., COLLEY, D.G. 1997. *Schistosoma mansoni*: susceptibility differences between male and female mice can be mediated by testosterone during early infection. Experimental Parasitology, 85, 233-240.

PELLEGRINO, J., FARIA, J. 1965. The oogram method for the screening of drugs in schistosomiasis mansoni. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 14, 363-369.

PELLEGRINO, J., KATZ, N. 1969. Experimental chemotherapy of schistosomiasis. IV. Oogram studies with nicarbazin, an egg-suppressive agent. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 11, 215-221.

PICA-MATTOCCIA, L., CIOLI, D. 2004. Sex- and stage- related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. International Journal of Parasitology, 34, 527-533.

PYRRHO, A.S., RAMOS, J.A., MOURA NETO, R., SILVA, C.S., LENZI, H.L., TAKIYA, C.M., GATTASS, C.R. 2002. Dexamethasone, a drug for attenuation of *Schistosoma mansoni* infection morbidity. Antimicrobial agents and chemotherapy, 46, 3490-3498.

REY, L. 2001. Parasitologia Médica, 32, 342-477, Editora Guanabara Koogan, 2ª Edição.

SKELLY, P.J., EVAN SECOR, W., REIS, M.G., RAMOS, E.A., CARMO, T.M., PEIXOTO, E.E., HARN, D.A. 1994. Failure of schistosomiasis to significantly decrease testosterone levels in Brazilian men. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 51, 40-44.

WHO. 2006. Schistosomiasis and soil-transmitted helminth infections-preliminary estimates of the number of children treated with albendazole or mebendazole. *Weekly Epidemiological Record*, 81, 145-164, Geneva.

Tabela 1: Atividade esquistossomicida de Testosterona (700µg/camundongo) e/ou PZQ (250µg/kg)

Grupo Experimental	Número de vermes recuperados			Média	DP	Eficácia (%)
	Machos	Fêmeas	Total			
Controle	167	26	193	38,60	5,03	-
Testosterona (G1)	112	31	143	28,60	5,595	25,90*
PZQ (G2)	43	9	52	10,40	3,43	73,05*
PZQ + testosterona (G3)	8	5	13	1,625	1,685	95,80*

*P<0,001, comparado com o grupo controle

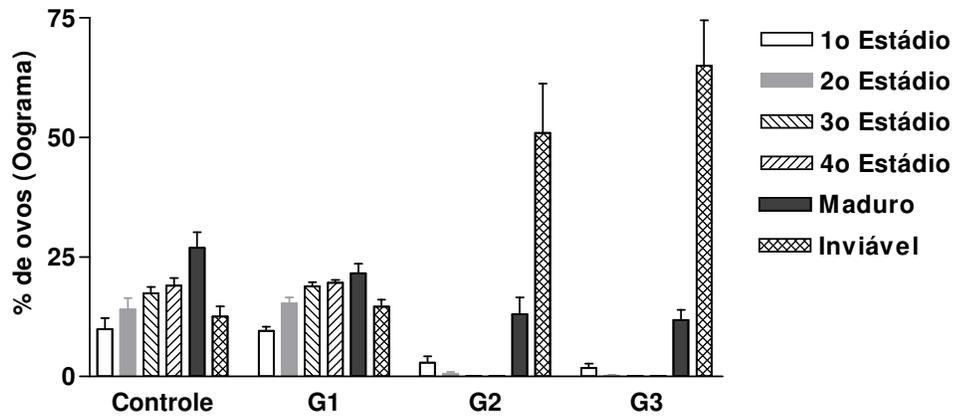


FIGURA 1: Oograma de camundongos infectados por *S. mansoni*, e tratados com Testosterona (700 μ g/camundongo) e/ou PZQ (250 μ g/kg)

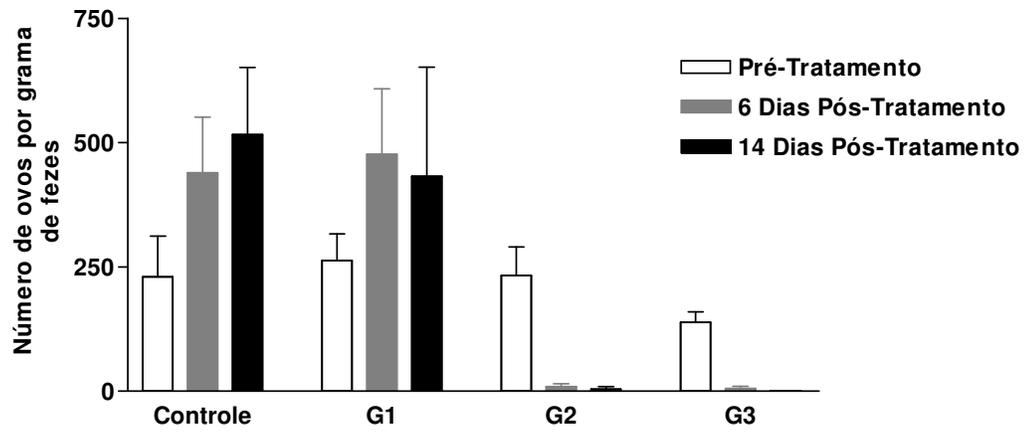


FIGURA 2: Média de ovos por grama de fezes de camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados com Testosterona (700 μ g/camundongo) e/ou PZQ (250 μ g/kg)

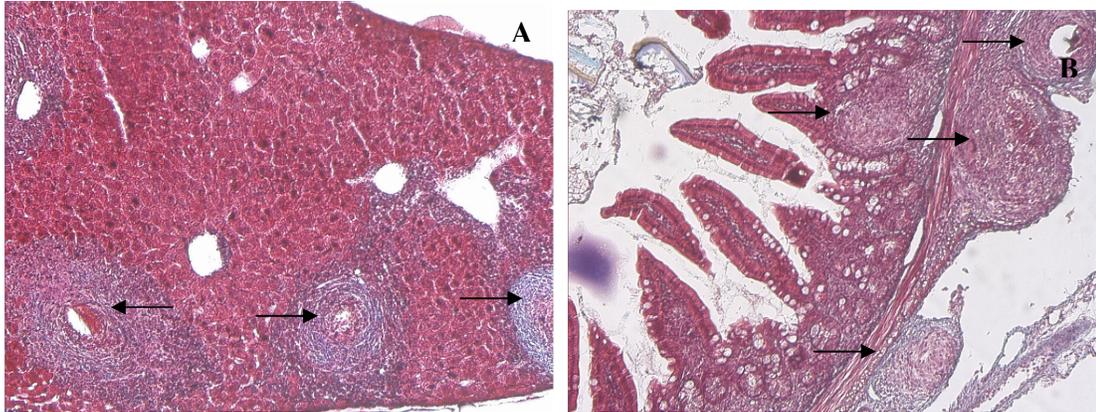


FIGURA 3: Fotomicrografias de granulomas esquistossomóticos em camundongos Controle: A) granulomas dispersos no parênquima hepático em torno de resto de ovo (←), envolto por intenso emaranhado de fibras colágenas: T.M. (100X), B) Reação granulomatosa (←), também, na região da camada muscular externa: T.M. (100X).

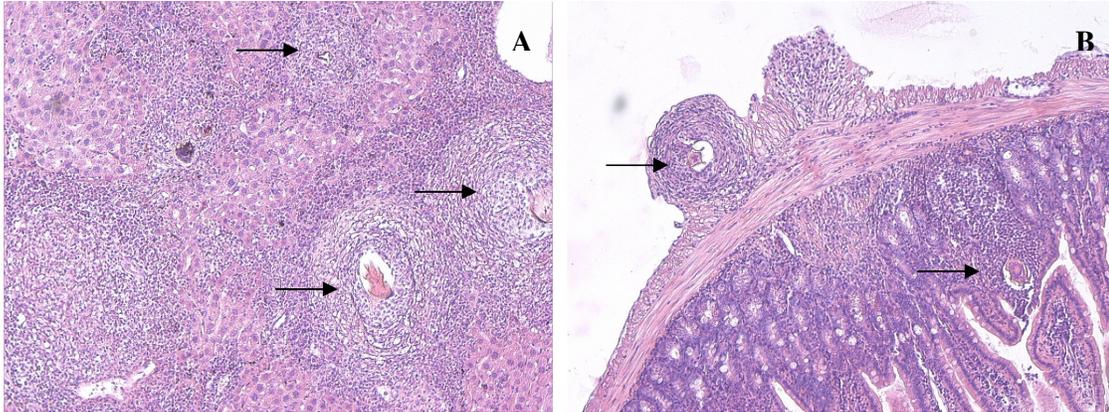


FIGURA 4: Fotomicrografias de granulomas esquistossomóticos em camundongos tratados com testosterona - 700 μ g/camundongo (G1). A) granulomas hepáticos em torno de resto de ovo, envolto por intenso emaranhado de fibras colágenas: H.E. (100X), B) Intensa reação granulomatosa na lâmina própria da mucosa intestinal e na região da camada serosa: H.E. (100X).

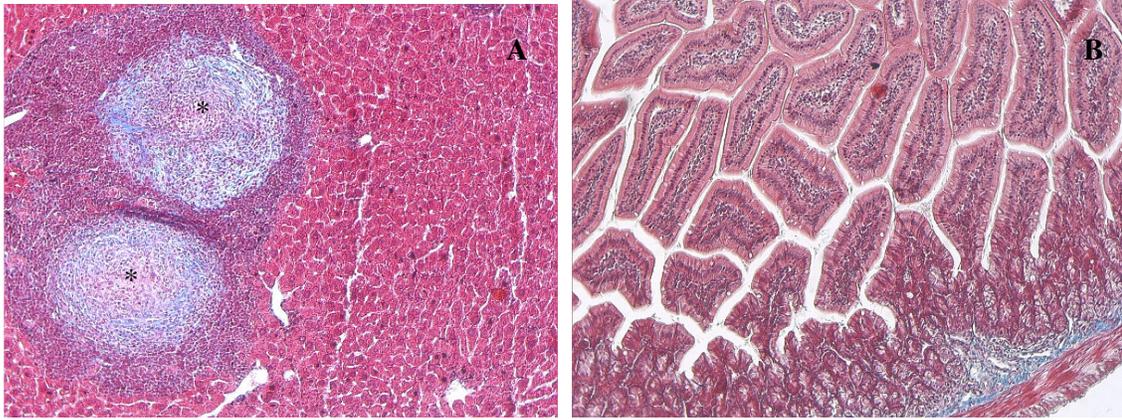


FIGURA 5: Fotomicrografias de fígado e intestino de camundongos tratados com praziquantel - 250 mg/kg (G2). A) Granulomas hepáticos em fase de resolução (*): T.M. (100X), B) Mucosa intestinal preservada: T.M. (100X).

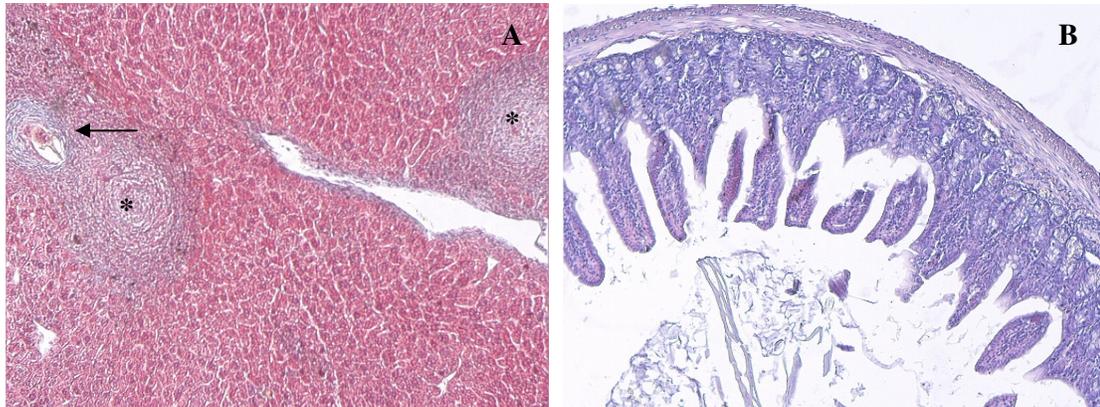


FIGURA 6: Fotomicrografias de fígado e intestino de camundongos tratados com praziquantel - 250 mg/kg e testosterona - 350 μ g/camundongo (G3). A) Granuloma hepático ao redor de ovo (\leftarrow) e granuloma em fase de resolução (*): T.M. (100X). B) Mucosa intestinal preservada: H.E. (100X).

8. CONCLUSÕES GERAIS

- A testosterona apresenta-se eficaz no tratamento da esquistossomose mansoni, melhorando a ação esquistossomicida do praziquantel.
- Os benefícios da associação de testosterona e praziquantel demonstraram ser dependentes da dose administrada.
- Na dose 350µg/camundongo a testosterona reduziu a carga parasitária e aumentou a inviabilidade dos ovos de *S. mansoni* quando associada ao praziquantel.
- Quando administrada na dose de 700µg/camundongo, a redução de carga parasitária e aumento da inviabilidade dos ovos também foram observados no grupo experimental onde houve apenas administração de testosterona.
- Com relação à quantidade de ovos liberados nas fezes, não houve alterações desse parâmetro nos grupos tratados com testosterona em relação ao grupo controle, independente de estar associada ou não ao agente esquistossomicida.
- O tratamento com PZQ promoveu uma maior preservação dos tecidos hepático e intestinal, não havendo uma potenciação desse efeito protetor pela testosterona.
- O mecanismo pelo qual a testosterona age, produzindo redução de carga parasitária e inviabilidade dos ovos de parasita, ainda não está definido.

ANEXOS

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Ofício nº 11/2004

Recife, 19 de maio de 2004

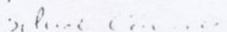
Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para Glória Isolina Pinto Duarte
Departamento de Fisiologia CCB/UFPE

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado "Desenvolvimento e Avaliação Farmacológica e Clínica de Novos Medicamentos para Esquistossomose", processo Nº 003870/2004-94.

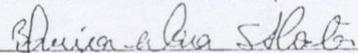
Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

De acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos, ressaltamos ainda que o sacrifício dos animais experimentais, realizado no presente trabalho, justifica-se pelo fato de não existirem recursos alternativos para a realização do procedimento científico. Diante do exposto, emitimos um parecer favorável aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,



Profa. Silene Carneiro do Nascimento
Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal



Profa. Belmfra Lara da S. Andrade da Costa
Vice-Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal

DECLARAÇÃO DE APRESENTAÇÃO EM CONGRESSO

