

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Thais Kelen Puiatti Viana

**Avaliação do potencial terapêutico do tiabendazol para tratamento da
esquistossomose mansoni experimental**

Juiz de Fora

2023

Thais Kelen Puiatti Viana

Avaliação do potencial terapêutico do tiabendazol para tratamento da esquistossomose mansoni experimental

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Orientadora: Dra. Priscila de Faria Pinto

Co-orientadora: Dra. Patrícia Martins Parreiras

Juiz de Fora

2023

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo (a) autor(a).

Puiatti Viana, Thaís Kelen.

Avaliação do potencial terapêutico do tiabendazol para tratamento da esquistossomose mansoni experimental / Thaís Kelen Puiatti Viana. -- 2023.

84 p.

Orientadora: Priscila de Faria Pinto

Coorientadora: Patrícia Martins

Parreiras

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica.

Programa de

Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2023.

1. Tiabendazol. 2. Praziquantel. 3. *Schistosoma mansoni*.

I. de Faria Pinto, Priscila, orient. II. Martins Parreiras, Patrícia, coorient.

III. Título.

Thaís Kelen Puiatti Viana

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos.

Aprovada em 18 de janeiro de 2023.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Priscila de Faria Pinto -
Orientadora Universidade Federal
de Juiz de Fora

Dra. Patrícia Martins Parreiras -
Coorientadora Instituto René
Rachou (Fiocruz/MG)

Dra. Lauren Hubert Jaeger
Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Josué de Moraes
Universidade de Guarulhos

Juiz de Fora, 16/12/2022



Documento assinado eletronicamente por Priscila de Faria Pinto, Professor(a), em 23/01/2023, às 17:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Lauren Hubert Jaeger, Professor(a), em 24/01/2023, às 15:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Josué de Moraes, Usuário Externo, em 24/01/2023, às 16:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por PATRICIA MARTINS PARREIRAS, Usuário Externo, em 31/01/2023, às 09:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 1081966 e o código CRC 4ADE53F5.

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo
para todo o propósito debaixo do céu”.*

Eclesiastes 3:1

AGRADECIMENTOS

A conclusão deste mestrado somente foi possível pela presença de Deus. Agradeço a Ele, pois me sustentou nos momentos em que estive sozinha e quando já não havia forças para prosseguir.

Aos meus pais, Dagoberto e Ivania que me ensinaram tudo que sou e me incentivaram sempre a continuar a adquirir novos conhecimentos e a correr atrás de meus sonhos. Amo vocês.

Agradeço a meu irmão gêmeo Rogério, por todo apoio, carinho e incentivo a permanecer mesmo diante das dificuldades encontradas pelo caminho.

A minha avó materna Maria Tereza que mesmo sem entender o motivo da leitura de tantos artigos sempre me incentivou. Obrigada pelo seu amor e também pelas suas orações.

A meu avô Paulo, que faleceu nesse ano, tenho certeza que estaria orgulhoso dessa minha conquista.

Aos meus amigos de laboratório e de convivência em Juiz de fora, Júlio e Beatriz. Obrigada por cada sorriso, conversas e almoços juntos. Esses momentos tornaram a vida muito mais leve e tranquila. Amo vocês!

As minhas companheiras de república, por todos os momentos de desabafos, surtos e risadas. Vocês tornaram a convivência mais tranquila.

A técnica do laboratório de bioquímica Raíssa por todos os conselhos, suporte técnico e ajuda durante os experimentos. Obrigada!

A minha orientadora Priscila, por ter me acolhido com tanto amor em seu laboratório e em sua vida. Obrigada por todo conhecimento compartilhado e por ter acreditado em mim.

A minha co-orientadora, Patrícia, por todo suporte, ensinamento e trabalho laboratorial.

Agradeço a Fiocruz- BH pelo suporte técnico nos ensaios iniciais e por todo apoio necessário.

Agradeço aos meus amigos da minha cidade de Barbacena, Carlos, Paloma, Angélica, Brenda, Thayani, Lavínia, Giulian e Vanessa. Amizades que a distância não diminui e o tempo não apagará jamais. Se hoje concluo esta etapa, foi em grande parte, porque vocês estiveram desde o início. Amo imensamente vocês.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade dessa conquista.

A CAPES e Fapemig pelos recursos fornecidos para a execução deste trabalho.

E a todos que contribuíram de forma direta e indireta para que eu concluísse mais essa etapa em minha vida. Muito obrigada.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada, endêmica em diversos países e que gera graves consequências socioeconômicas. É causada pelo trematódeo do gênero *Schistosoma*. A falta de uma vacina reforça o papel da quimioterapia como controle da morbidade e transmissão da doença. Atualmente, o fármaco mais utilizado é o praziquantel, porém não apresenta forma farmacêutica pediátrica. Seu sabor amargo e o tamanho do comprimido fazem com que o tratamento não seja completamente aderido ao público infantil. Além disso o praziquantel não previne a reinfecção. Desta forma é necessária outra forma de tratamento, assim, foi avaliada a eficácia do fármaco tiabendazol na forma de suspensão, uma vez que é destinado ao uso pediátrico. Para comprovar a eficácia do tiabendazol, camundongos da linhagem Swiss, preferencialmente fêmeas, foram infectados com 80 ± 10 cercárias/animal. Um total de 136 animais foram separados em grupos para diferentes tratamentos como, um grupo não infectado e não tratado; um grupo controle composto por animais infectados e não tratados; um grupo de animais controle positivo, infectados e tratados com uma dose de praziquantel (400mg/Kg). Os demais grupos de animais receberam doses de tiabendazol 50mg/kg e tiabendazol 100mg/kg por via oral após 30 dias da infecção, período este para avaliação do efeito do tratamento em vermes jovens. Outros grupos, receberam as mesmas doses de tiabendazol 50 mg/kg e tiabendazol 100 mg/kg por via oral, porém, o tratamento foi após 45 dias da infecção para avaliar o efeito do tratamento em vermes adultos. A ação esquistossomicida foi analisada após 7 dias de tratamento, por meio da eutanásia dos animais. O tratamento proposto com tiabendazol em ambas concentrações não reduziu a carga parasitária e nem interferiu na oviposição. A análise do peso hepático e esplênico indicou aumento dessas massas com o decorrer da infecção quando comparado ao grupo G2. O estudo sobre a área dos granulomas revelou que os grupos tratados com TBZ apresentaram uma menor área. Foi analisado a produção de anticorpos frente aos antígenos SEA e SWAP e os grupos G4 e G5 não apresentaram reatividade significativa quando comparada ao grupo G2. Por fim, o ensaio de hepatotoxicidade mostrou que o TBZ nas doses de 50 mg/kg e 100 mg/kg não apresentou toxicidade. Concluindo, o reposicionamento do fármaco tiabendazol no esquema terapêutico empregado de duas doses nas concentrações de 50 mg/kg e 100 mg/kg não se classifica como uma boa opção terapêutica no

combate da esquistossomose mansônica. Diante dos dados obtidos é necessário realizar novos ensaios com este fármaco.

Palavras-chave: Tiabendazol. Praziquantel. *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected tropical disease, endemic in several countries, and generates serious socioeconomic consequences. The causative trematode belongs to the genus *Schistosoma spp.* The lack of a vaccine reinforces the role of chemotherapy in controlling morbidity and disease transmission. The most used drug is praziquantel, yet it does not have a pediatric dosage form. Its bitter taste and the size of the tablet contribute to keeping the treatment from being adhered to by children. Furthermore, praziquantel does not prevent reinfection. Consequently, another treatment option is necessary, thus, the effectiveness of the drug thiabendazole in the suspension form was evaluated, since it is intended for pediatric use. To verify the thiabendazole effectiveness, Swiss mice, preferably females, were infected with 80 ± 10 cercariae/animal. A total of 136 animals were divided into groups for different treatments, such as an uninfected and untreated group; a control group composed of infected and untreated animals; a positive control group with infected animals treated with a dose of praziquantel (400mg/Kg). The other groups of animals received oral doses of thiabendazole 50mg/kg and thiabendazole 100mg/kg after 30 days of infection, this period was intended for evaluating the effect of the treatment on young worms. Other groups received the same oral doses of thiabendazole 50mg/kg and thiabendazole 100mg/kg, however, the treatment was after 45 days of infection to evaluate the effect of the treatment on adult worms. The schistosomicidal action was analyzed after 7 days of treatment, through the euthanasia of the animals. The proposed thiabendazole treatment in both concentrations did not reduce the parasite load and did not interfere with oviposition. The liver and splenic weight analysis indicated an increase in these masses with the course of the infection when compared to the group G2. The study on the granuloma area revealed that the groups treated with TBZ had a smaller area. The production of antibodies was analyzed against the SEA and SWAP antigens and the groups G4 and G5 did not show significant reactivity when compared to group G2. Finally, the hepatotoxicity assay showed that TBZ in the used doses of 50 and 100 mg/kg did not show toxicity. In conclusion, the repositioning of the drug thiabendazole in the two-dose therapeutic scheme used at concentrations of 50 mg/kg and 100 mg/kg is not classified as a good therapeutic option in the fight against schistosomiasis mansoni. Given the data obtained, it is necessary to carry out new tests with this drug.

Keywords: Thiabendazole. Praziquantel. *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de vida dos esquistossomídeos.	19
Figura 2 - Estrutura química do Praziquantel	23
Figura 3 - Estrutura química do tiabendazol	25
Figura 4 - Fígado e Baço dos animais eutanasiados.....	31
Figura 5 - Aspectos gerais dos ovos de <i>S. mansoni</i> recuperados na análise qualitativa do oograma.	32
Figura 6 - Fotomicrografias de áreas de granulomas hepáticos em cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE). Foram medidas 15 áreas/campos/animal contendo um único ovo bem central no granuloma. Em (A) granuloma com um ovo bem definido ao centro. Em (B) a circunferência delimita área do granuloma utilizada nas mensurações e em (C) corte histológico contendo dois granulomas com ovos próximos, impossibilitando a delimitação da área.	33
Figura 7 - Avaliação da carga parasitária dos animais tratados com tiabendazol 30 e 45 dias após a infecção. Os vermes adultos foram recuperados por perfusão de camundongos Swiss experimentalmente infectados por <i>S. mansoni</i> submetidos ao tratamento com praziquantel, tiabendazol 50 mg/kg e tiabendazol 100 mg/kg.	36
Figura 8 - Número de vermes adultos recuperados dos animais infectados e tratados (n=5) com os compostos PZQ e TBZ 50mg/kg e TBZ 100 mg/kg 30 dias pós infecção.	38
Figura 9 - Representação gráfica do peso médio do fígado e baço de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> e tratados com praziquantel e tiabendazol aos 30 dias PI.	40
Figura 10 - Representação gráfica do peso individual dos órgãos removidos (fígado e baço) dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por <i>S. mansoni</i> aos 30 dias PI.....	41
Figura 11 - Representação gráfica do peso médio dos órgãos removidos (fígado e baço) dos grupos de tratamento TBZ 50 mg/kg e TBZ 100 mg/kg após eutanásia dos animais infectados por <i>S. mansoni</i>	42
Figura 12 - Representação gráfica do peso individual dos órgãos removidos (fígado e baço) dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por <i>S. mansoni</i>	43

Figura 13 - Percentual de ovos imaturos, maduros e ovos contendo miracídios mortos em fragmento da porção íleo-terminal do intestino dos camundongos tratados com tiabendazol.....	45
Figura 14 - Avaliação da presença de anticorpos contra os antígenos SEA e SWAP em camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> referente ao período de 30 PI.	47
Figura 15 - Avaliação da carga parasitária dos animais tratados com tiabendazol 30 dias após a infecção. Vermes adultos foram recuperados por perfusão de camundongos Swiss experimentalmente infectados por <i>S. mansoni</i> submetidos ao tratamento com praziquantel, tiabendazol 50 mg/kg e tiabendazol 100 mg/kg.	49
Figura 16 - Número de vermes adultos recuperados dos animais estudados (n=5) 30 dias pós infecção.....	51
Figura 17 - Avaliação da carga parasitária dos animais tratados com tiabendazol 45 dias após a infecção. Vermes adultos foram recuperados por perfusão de camundongos Swiss experimentalmente infectados por <i>S. mansoni</i> submetidos ao tratamento com praziquantel, tiabendazol 50 mg/kg e tiabendazol 100 mg/kg.	52
Figura 18 - Número de vermes adultos recuperados dos animais infectados e tratados com os compostos (n=5) 45 dias pós infecção..	54
Figura 19 - Representação gráfica do peso médio do fígado dos grupos após eutanásia dos animais infectados por <i>S. mansoni</i> . Os animais iniciaram seu tratamento 30 dias após a infecção.....	55
Figura 20 - Representação gráfica do peso individual do fígado removido dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por <i>S. mansoni</i> referente ao tratamento 30 dias após a infecção.....	56
Figura 21 - Peso dos órgãos de camundongos após 45 dias de infecção. No eixo vertical se encontra os grupos de animais tratados e na horizontal os pesos correspondentes aos órgãos. As diferenças estatísticas estão representadas em relação ao grupo G1.....	57
Figura 22 - Representação gráfica do peso individual dos órgãos removidos (fígado e baço) dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por <i>S. mansoni</i> . Os animais iniciaram seu tratamento 45 dias após a infecção.	58
Figura 23 - Percentual de ovos imaturos, maduros e que continham miracídios mortos nas lâminas contendo fragmento da porção íleo-terminal do intestino dos camundongos.....	60

Figura 24 - Área média dos granulomas encontrados em cortes histológicos do fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> nos períodos de 30 dias PI (A) e 45 dias PI (B).....	63
Figura 25 - Avaliação da presença de anticorpos contra o antígeno SWAP em camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> . Em (A) refere período de 30 dias PI. Em (B) período de 45 dias PI.....	65
Figura 26 - Representação gráfica da média das concentrações das proteínas AST e ALT encontradas nos soros de camundongos Swiss infectados com <i>S. mansoni</i> nos períodos de 30 dias PI nos grupos de tratamentos.	66
Figura 27 - Representação gráfica da média das concentrações das proteínas AST e ALT encontradas nos soros de camundongos Swiss infectados com <i>S. mansoni</i> nos períodos de 45 dias PI nos grupos de tratamentos.	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Disposição dos animais nos grupos experimentais e seus respectivos esquemas de terapêuticos.	30
Tabela 2 - Avaliação da carga parasitária recuperada de camundongos Swiss infectados com <i>S. mansoni</i> e submetidos a diferentes terapias farmacológicas.....	37
Tabela 3 - Peso médio dos órgãos removidos (fígado e baço) dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por <i>S. mansoni</i> . O tratamento foi iniciado aos 30 dias após a infecção.	39
Tabela 4 - Peso médio dos órgãos removidos (fígado e baço) dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por <i>S. mansoni</i> . O tratamento foi iniciado aos 45 dias após a infecção.	42
Tabela 5 - Média dos números de ovos imaturos, maduros e contendo miracídios mortos em fragmento da porção íleo-terminal do intestino dos camundongos nos diferentes grupos de tratamentos no período de 30 e 45 dias PI.	44
Tabela 6 - Avaliação da carga parasitária recuperada de camundongos Swiss infectados com <i>S. mansoni</i> e submetidos a diferentes terapias farmacológicas em 30 dias PI.	49
Tabela 7 - Avaliação da carga parasitária recuperada de camundongos Swiss infectados com <i>S. mansoni</i> e submetidos a diferentes terapias farmacológicas em 45 dias PI.	53
Tabela 8 - Peso médio do fígado dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por <i>S. mansoni</i> . Os animais iniciaram o tratamento 30 dias após a infecção.	56
Tabela 9 - Peso médio dos órgãos removidos dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por <i>S. mansoni</i> . Os animais iniciaram seu tratamento 45 dias após a infecção.....	57
Tabela 10 - Média dos números de ovos imaturos, maduros e que continham miracídios mortos nas lâminas contendo fragmento da porção íleo-terminal do intestino dos camundongos nos diferentes grupos de tratamentos no período de 30 dias PI e 45 dias PI.	61
Tabela 11 - Área média dos granulomas encontrados nos cortes de fígado de camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> nos períodos respectivos de tratamento.	62

Tabela 12 - Valores bioquímicos dos marcadores séricos ALT e AST, obtidos no soro de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, nos períodos de 30 e 45 dias PI.

.....66

LISTA DE ABREVIações

ALT	Aspartato aminotransferase
AST	Alanina aminotransferase
BODIPY	Boro dipirometeno
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay</i> (Ensaio Imunoenzimático)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IHAs	Ensaio de hemaglutinação indireta
KK	Kato-Katz
OMS	Organização mundial da saúde
OPD	Peroxidase Substrate (Substrato de peroxidase)
OXA	Oxamniqué
PI	Pós infecção
P&D	Pesquisa e desenvolvimento
PZQ	Praziquantel
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
SEA	<i>Soluble Egg Antigen</i> (Antígeno solúvel do ovo)
SUS	Sistema único de saúde
SWAP	<i>Soluble Worm Antigen</i> (Antígeno solúvel de verme adulto)
TBZ	Tiabendazol

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 ESQUISTOSSOMOSE: ASPECTOS GERAIS.....	18
1.2 CICLO DE VIDA DO PARASITO E DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA ...	20
1.3 DIAGNÓSTICO CLÍNICO – LABORATORIAL	21
1.4 QUIMIOTERAPIA DA ESQUISTOSSOMOSE	22
1.5 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS E O USO DO TIABENDAZOL NA TERAPIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI	24
2. OBJETIVOS	27
2.1. OBJETIVO GERAL	27
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS.....	27
3.2 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO DIÁRIO DOS ANIMAIS	28
3.3 ENSAIOS <i>IN VIVO</i> , TRATAMENTO E AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA DOS ANIMAIS	28
3.4 RECUPERAÇÃO DOS VERMES.....	30
3.5 PESO HEPÁTICO E ESPLÊNICO	31
3.6 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DO OOGRAMA	31
3.7 AVALIAÇÃO DAS ÁREAS GRANULOMATOSAS	32
3.8 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SEA e ANTI-SWAP NO SORO DOS ANIMAIS POR ELISA	33
3.9 ENSAIO DOS MARCADORES ENZIMÁTICOS DE HEPATOTOXIDADE ...	34
3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
3.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	35
4 RESULTADOS	36
4.1 PRIMEIRO EXPERIMENTO	36

4.1.1	Avaliação da atividade esquistossomicida	36
4.1.2	Peso hepático e esplênico	39
4.1.3	Avaliação quali-quantitativa do oograma	43
4.1.4	Detecção de anticorpos no soro dos animais por ELISA	46
4.2	SEGUNDO EXPERIMENTO	48
4.2.1	Avaliação da atividade esquistossomicida	48
4.2.2	Peso hepático e esplênico	55
4.2.3	Avaliação quali-quantitativa do oograma	59
4.2.4	Análise das áreas granulomatosas	61
4.2.5	Detecção de anticorpos no soro dos animais por ELISA	63
4.2.6	Ensaio dos marcadores enzimáticos de hepatotoxicidade.	65
5.	DISCUSSÃO	68
6.	CONCLUSÃO	74
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXO	84
	ANEXO A – LICENÇA CEUA/FIOCRUZ.....	84

1. INTRODUÇÃO

1.1 ESQUISTOSSOMOSE: ASPECTOS GERAIS

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são causadas por agentes infecciosos e afetam milhões de pessoas em todo mundo, em especial aquelas regiões menos favorecidas, consideradas de alto risco. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), são listadas como doenças tropicais: filariose linfática, raiva, leishmaniose, cisticercose, oncocercose, doença de chagas, hanseníase, tuberculose, esquistossomose, tripanossomíase africana e dengue (OMS, 2010).

A esquistossomose, conhecida popularmente por barriga d'água, é um grave problema de saúde pública no mundo, com caráter endêmico na África, América do Sul, China e Sudeste Asiático (ABDULLA et al., 2007). Está diretamente associada a fatores como saneamento básico precário e má distribuição de água encanada (OMS, 2020). Em termos de morbimortalidade, é considerada uma das doenças parasitárias de humanos mais importante. Segundo a OMS (2020), a transmissão da esquistossomose foi relatada em 78 países. Estima-se que 90% das pessoas contaminadas que precisam de tratamento vivem no continente africano.

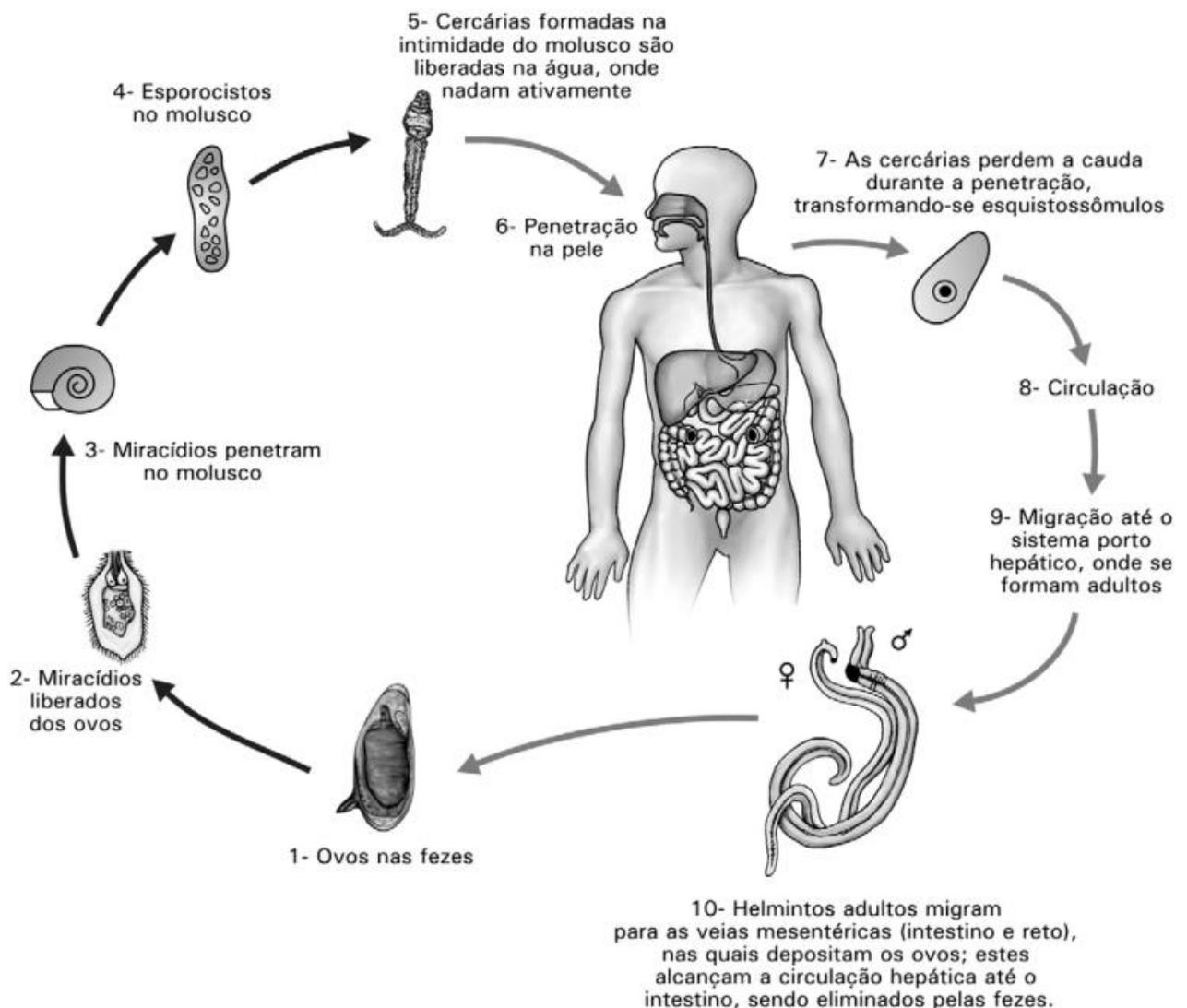
Sua ocorrência está vinculada a áreas endêmicas e obedece um padrão epidemiológico decorrente da combinação de características ambientais relacionadas, ao agente etiológico e aos hospedeiros (intermediário e definitivo) (KATZ, 2018). Desta forma, a distribuição geográfica é limitada à distribuição dos caramujos que são os hospedeiros intermediários, assim no Brasil, a região Nordeste e Sudeste são as mais afetadas (LOVERDE, 2019; WHO, 2022).

Esta parasitose é causada pelo helminto trematódeo do gênero *Schistosoma*. Os três principais esquistossomos que infectam os humanos são *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, e *S. japonicum*. A transmissão e manutenção da doença (Figura 1) necessitam da presença de hospedeiros intermediários (caramujos do gênero *Biomphalaria*) e hospedeiros mamíferos (principalmente o homem), ambos essenciais para o completo desenvolvimento do parasito (OLIVEIRA, 2005).

Historicamente, a esquistossomose foi introduzida no Brasil por meio do tráfico dos escravos, oriundos da África. Este tráfico trouxe grande parte dos escravos infectados pelos helmintos do gênero *Schistosoma spp.* para o território nacional. A espécie que se estabeleceu foi a *S. mansoni* devido à presença do hospedeiro

intermediário susceptível (KATZ, 2018). Esta espécie de *Schistosoma* é um dos agentes infecciosos mais abundantes no mundo. Sua distribuição é devido a ampla distribuição geográfica de espécies do gênero *Biomphalaria*, que são os hospedeiros obrigatórios para seus estágios larvais (MORGAN et al., 2001).

Segundo Rollemberg (2011), as parasitoses intestinais têm alta prevalência no Brasil, independentemente das frequências pontuais, em diferentes populações. Em 1988, a prevalência era de 55,3% em crianças, sendo que a maior parte era poliparasitada (ROLLEMBERG et al., 2011).



Fonte: SOUZA et al. (2011).

Figura 1 - Ciclo de vida dos esquistossomídeos.

1.2 CICLO DE VIDA DO PARASITO E DESENVOLVIMENTO DA DOENÇA

O ciclo de vida dos principais esquistossomos é semelhante; as diferenças consistem principalmente nas espécies intermediárias de caramujos envolvidas e nas diferenças na distribuição dos tecidos nos hospedeiros definitivos. O ciclo é considerado complexo pois envolve dois hospedeiros podendo ser sexuado e assexuado. O ciclo sexuado ocorre no hospedeiro primário que é o homem, já no caramujo, que é o hospedeiro intermediário, ocorre o ciclo assexuado (SIQUEIRA, 2017).

As formas adultas deste helminto se alojam nos vasos mesentéricos do hospedeiro e as formas intermediárias se desenvolvem nos caramujos gastrópodes do gênero *Biomphalaria*. Após passar pela mucosa intestinal, os ovos são eliminados com as fezes que, ao serem arrastadas para as águas superficiais, liberam os miracídios, que nadam até encontrar os caramujos. Os miracídios, por apresentarem cílios, eclodem dos ovos e nadam em direção aos moluscos susceptíveis ao seu desenvolvimento. Dentro do molusco, as larvas são transformadas em esporocistos que produzirão um grande número de cercárias, a forma infectante para os humanos. Após a penetração na pele humana, as cercárias tornam-se esquistossômulos (SIQUEIRA, 2017). Os esquistossômulos permanecem na pele por dias logo atingem a circulação sanguínea se alojando nos pulmões e fígado. Na circulação hepatoportal, eles amadurecem e se reproduzem sexuadamente. O desenvolvimento e a migração do esquistossomo são assíncronos. Assim que começam a crescer, os sexos podem ser facilmente diferenciados. O macho consegue se desenvolver totalmente na ausência da fêmea, entretanto a fêmea é atrofiada e não atinge a maturidade sexual na ausência do macho. Os vermes acasalam-se no fígado antes de migrar para o seu destino final, as veias mesentéricas (LOVERDE, 2019).

Os ovos postos pelas fêmeas são depositados no revestimento endotelial das paredes capilares. Esses se disseminam para outros órgãos e provocam uma inflamação que leva à formação de um granuloma ao redor do ovo. A eliminação dos ovos é feita no material fecal, concluindo assim o ciclo de vida do parasito (FALLON e DOENHOFF, 1994).

A doença na sua maioria das vezes se manifesta de forma assintomática sendo sua evolução de forma crônica. O sintoma clínico agudo relaciona-se com o desenvolvimento de uma erupção cutânea leve. É manifestado também febre, náusea,

vômito, fadiga e tosse seca, reações resultantes da migração dos esquistossômulos. Ao longo do estágio crônico da infecção, quase dois terços dos ovos são levados pela circulação sanguínea findando no fígado (MACEDÔNIA et al., 1994). No fígado, a inflamação granulomatosa que se manifesta ao redor dos ovos, provocam as principais patologias associadas a esta doença. A fibrose no fígado provoca obstrução e hipertensão portal ocasionando sangramento gastrointestinal, encefalopatia hepática e insuficiência hepática (ONGURU et al., 2011).

1.3 DIAGNÓSTICO CLINICO – LABORATORIAL

O diagnóstico da doença é conclusivo através dos resultados dos exames laboratoriais. O método tradicional de diagnóstico é através da detecção da presença de ovos do *S. mansoni* nas fezes do paciente após 45 dias de infecção. Segundo a OMS, o método Kato-Katz é o exame parasitológico de fezes mais recomendado pois é considerado mais rápido, de baixo custo técnico-operacional, de fácil execução e mais preciso qualitativa e quantitativamente (KATZ, 2003). No entanto, em infecções de baixa intensidade este método apresenta baixa sensibilidade e, portanto, não pode ser considerado atualmente o padrão-ouro (SILVA - MORAES et al., 2019).

Para gerar o resultado positivo, é necessário existir alguns fatores como carga parasitária, experiência do laboratorista e tempo de infecção. Por apresentar baixa sensibilidade, o exame de fezes deve ser realizado com no mínimo três amostras sequenciais de fezes, coletadas em dias distintos e tempo máximo de 10 dias entre a primeira e a terceira coleta (BRASIL, 2007). É utilizado também a biopsia retal que é mais positiva que os exames de fezes sendo muito importante no controle da cura; e as biópsias tissulares que fornecem o diagnóstico na avaliação histopatológica, representando, entretanto, mais achados do que métodos diagnósticos (SIQUEIRA-BATISTA, 2000).

Devido à baixa sensibilidade, tornou-se necessário encontrar novos métodos, assim estudos foram realizados em relação ao desenvolvimento de testes mais sensíveis. Foram avaliados diagnósticos com anticorpos, antígenos e DNA. Estas técnicas apresentam como vantagem a alta sensibilidade, porém sua especificidade reduzida em comparação com métodos baseados em microscopia as torna inadequadas como testes de uso único (SILVA - MORAES et al., 2019).

Os métodos imunobiológicos são mais utilizados na fase crônica da doença. São aplicados testes por meio de intradermoreação, reações de fixação complemento, imunofluorescência indireta, técnica imunoenzimática. A presença de anticorpos permanece após a quimioterapia, desta forma a positividade do exame não indica que a infecção esteja ativa. Essas são técnicas incapazes de diferenciar entre infecção ativa, passada ou reinfecção. Portanto, não conferem a comprovação da eficácia ao tratamento (VITORINO et al., 2012).

Os testes sorológicos mais utilizados comercialmente e avaliados para o diagnóstico de *S. mansoni* são o ELISAs (ensaio de imunoabsorção enzimática) ou IHAs (ensaio de hemaglutinação indireta). É limitado o uso de ELISA pois é necessária uma logística de cadeia de frio e uma quantidade maior de equipamentos. Já o IHA é mais rápido e simples sendo necessário equipamento mais simples. Entretanto, sua especificidade é mais baixa quando comparado com o ELISA (HINZ et al., 2017). Os imunoenaios apresentam alto desempenho e são métodos alternativos ao KK, porém não são otimizados para teste de uso único. Contudo, são considerados testes de triagem potenciais que podem levar a diagnósticos precisos. O uso unicamente do ELISA pode levar a um sobre tratamento significativo, porém sua combinação com outros métodos parasitológicos diminui o consumo de tempo durante o trabalho de campo (SILVA – MORAES et al., 2019).

É perceptível que a combinação de ensaios sorológicos e parasitológicos melhoram o diagnóstico de infecções de baixa intensidade em estudos clínicos e epidemiológicos. Em casos agudos, os métodos de IgA/IgM/IgG-ELISA podem fornecer alternativas para apoiar a decisão de tratamento na ausência de ovos nas fezes. Já em populações com risco de infecção, uma triagem preliminar utilizando métodos de detecção de anticorpos, como IgM/IgG ELISA, aumenta a sensibilidade da investigação (SILVA - MORAES et al., 2019).

1.4 QUIMIOTERAPIA DA ESQUISTOSSOMOSE

As intervenções para controlar a esquistossomose têm variado ao longo do tempo. O tratamento está direcionado a pacientes com o diagnóstico positivo em uma área endêmica e no retorno de viajantes. O objetivo do tratamento é a cura. No Brasil, a terapia farmacológica está baseada na utilização de dois fármacos: o praziquantel (PZQ) e a oxamniquine (OXA) (MCMANUS et al., 2018). Devido ao baixo custo,

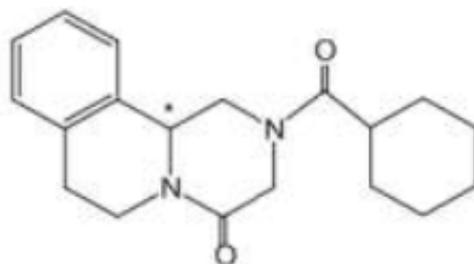
segurança e alta eficácia, o praziquantel é utilizado atualmente como tratamento padrão (CRELLEN et al., 2016).

O PZQ está sendo utilizado em programas de “quimioterapia preventiva” onde é distribuído a crianças em idade escolar ou a populações de risco, dependendo das taxas de prevalência (VALE et al., 2017). Segundo OMS, dados de 2019 revelam que 44,5% das pessoas que necessitam de tratamento foram alcançadas globalmente, com uma proporção de 67,2% das crianças em idade escolar que necessitam de quimioterapia preventiva para a esquistossomose sendo tratadas (WHO, 2022).

Inicialmente, o PZQ foi desenvolvido pelos laboratórios Bayer e Merck em meados de 1970. Após perder a patente nos anos 2000, começou a ser produzido no Brasil pelo Instituto de Tecnologia e Fármacos (Farmanguinhos/FioCruz) e distribuído gratuitamente pelo Sistema Único de Saúde–SUS (DE ALMEIDA, 2021). É dito como essencial sendo fornecido pelo Ministério da Saúde através da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME, 2020).

Segundo a RENAME (2020), o PZQ é fornecido na posologia de 600mg e na forma farmacêutica de comprimidos. A recomendação é dose única, de 50 mg/kg para adultos e de 60 mg/kg para crianças, sendo digeridos após a refeição, entretanto, seu uso é difícil para crianças menores de 6 anos, que ficam sem opção de tratamento.

Atualmente, o PZQ é disponível em sua forma racêmica (figura 2), que inclui uma parte biologicamente ativa e outra inativa. Isso requer o uso de um comprimido de 600 mg para fornecer uma dose ativa de 40 mg/kg (VALE et al., 2017). A OMS recomenda que o PZQ seja usado em dose única de 40 mg / kg (DANSO et al., 2013). Segundo LoVerde (2019), as taxas de cura do PZQ são geralmente 60–90%.



Fonte: Adaptado de CAFREY (2007).

Figura 2 - Estrutura química do Praziquantel

Segundo Olliaro e colaboradores (2014), o enantiômero inativo é responsável pelo sabor amargo que o comprimido apresenta. Este sabor desagradável contribui para o tratamento ineficiente em crianças em idade escolar, pois muitas vezes as crianças evitam ingerir o fármaco devido ao seu sabor pouco agradável. O PZQ apresenta também outras desvantagens como a diminuição ou ausência completa de atividade contra esquistossomos juvenis. Assim, uma cura completa não é alcançada de forma confiável com uma única dose, principalmente porque a reinfecção é comum (VALE et al., 2017).

O mecanismo de ação deste fármaco está relacionado com a produção de danos ao tegumento do verme, o que conseqüentemente expõe os antígenos e possibilita o ataque dos mecanismos imunológicos do hospedeiro (MODHA et al., 1990; RIBEIRO et al., 2004). O fármaco provoca paralisia muscular nos vermes que está associada a um influxo de íons de cálcio. Devido a alteração no transporte de íons após o tratamento com PZQ, muitos esforços têm se concentrado nos transportadores e canais de íons como alvos potenciais do PZQ (LOVERDE, 2019).

Segundo o Biopharmaceutics Classification System e o Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System, o PZQ apresenta alta capacidade de permear os tecidos e baixa solubilidade (0,4 mg/ml) e prossegue através de extenso metabolismo via hidroxilação do fármaco absorvido em metabólitos inativos (BENET et al., 2011). A biodisponibilidade sistêmica do PZQ é baixa e varia consideravelmente entre os indivíduos. Sua biodisponibilidade aumenta com a ingestão conjunta de alimentos (VALE et al., 2017).

Embora eficazes contra os parasitos de *S. mansoni*, é relatado na literatura o surgimento de um fator de resistência a este fármaco (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1993). Diante disso, a busca por novos fármacos torna-se necessária.

1.5 REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACOS E O USO DO TIABENDAZOL NA TERAPIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

O processo de desenvolvimento de um novo fármaco (P&D) é complexo e requer alto custo além de necessitar de intenso esforços na área de gestão, inovação e tecnologia (ANDRICOPULO, GUIDO, OLIVA, 2008).

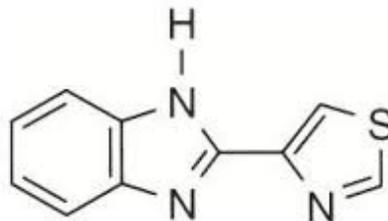
A técnica de reposicionamento de fármacos consiste na utilização de um fármaco já conhecido para o tratamento de novas doenças. Esta alternativa reduz os custos e a velocidade de desenvolvimento para a validação de um novo fármaco para uma terapia (CHONG e SULLIVAN, 2007), assim o tempo de P&D e os recursos envolvidos são diminuídos.

O tiabendazol (TBZ) é um fármaco que pertence à classe de compostos orgânicos conhecidos como benzimidazóis. Estes são compostos orgânicos contendo um anel benzênico fundido a um anel imidazol (anel de cinco membros contendo um átomo de nitrogênio, 4 átomos de carbono e duas ligações duplas), conforme figura 3.

É um agente anti-helmíntico e antifúngico de amplo espectro usado para combater infecções por vermes e fungos (DUBEY e SANYAL, 2010). É indicado para o tratamento de doenças parasitárias causadas por *Ascaris lumbricoides*, *Strongyloides stercoralis*, *Necator americanus*, *Ancylostoma duodenale*, *Ancylostoma braziliense*, *Trichuris trichiura*, *Toxocara canis*, *Toxocara cati* e *Enterobius vermicularis* (DRUGBANK, 2018).

É comercializado com o nome Thiaben® e Foldan®. Apresenta formas farmacêuticas líquidas e sólidas, sendo encontrado tanto em comprimidos quanto em suspensão. Não é referenciado como essencial, sendo assim não é distribuído de forma gratuita pelo SUS, desta forma seu uso é restrito.

Para a medicina humana, a dose diária máxima recomendada é de 3g/dia para pacientes com peso de 60 kg e a dose usual de 50 mg/kg de peso corporal (SEIDE et al., 2016).



Fonte: Adaptado GOODMAN & GILMAN (2012).

Figura 3 - Estrutura química do tiabendazol

Segundo o DRUG-BANK (2018), o TBZ é rapidamente absorvido e sua concentração plasmática é atingida dentro de 1 a 2 horas após a administração oral de uma suspensão e sua meia vida é de 1,2 horas. O fármaco é quase completamente metabolizado na forma 5-hidroxitiabendazol, sendo excretado na urina em 48 horas como conjugados de glicuronídeos ou sulfatos. A super dosagem pode estar associada a distúrbios transitórios da visão e alterações psíquicas.

Conforme Tracy e Webster (2001), os benzimidazóis atuam inibindo a enzima fumarato redutase específica de helmintos. Porém o principal mecanismo de ação é a ligação à beta-tubulina para inibir a polimerização dos microtúbulos. Os microtúbulos são fundamentais em alguns processos celulares, desta forma sua inibição leva a morte do organismo (KÖHLER, 2001).

Diante da alta prevalência desta doença em crianças torna-se imprescindível a busca por um tratamento farmacológico específico para o público infantil. A terapia farmacológica atual está baseada na utilização do PZQ, entretanto a formulação apresenta diversos problemas; como o tamanho grande do comprimido, o sabor amargo que tornam difícil a ingestão por crianças, além de que a dosagem de 600 mg não possibilita o ajuste de doses flexíveis para essa faixa etária (MDULUZA, MATUPI, 2017).

Desta forma, o presente estudo propôs a avaliação do potencial terapêutico do fármaco TBZ sobre a esquistossomose murina experimental, uma vez que apresenta formulação líquida disponível para o público pediátrico, é rapidamente absorvido na luz intestinal, sua meia vida é de 1-2 horas, além de ser um anti-helmíntico de amplo espectro de ação. Assim, reposicionar o fármaco TBZ é uma alternativa eficaz que reduz custos e tempo de processamento e desenvolvimento.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial terapêutico do tiabendazol sobre a esquistossomose mansoni experimental.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a efetividade deste fármaco sobre formas jovens e maduras dos vermes de *Schistosoma mansoni* durante a infecção experimental;

Verificar o efeito do tiabendazol sobre parâmetros relacionados à morbidade da doença como: peso hepático e esplênico e avaliação quali-quantitativa do oograma em fragmentos intestinais;

Avaliar a evolução dos granulomas hepáticos após tratamento com tiabendazol;

Avaliar quali e quantitativamente os anticorpos contra antígenos do ovo (SEA) e de vermes adultos (SWAP) nas amostras de soros.

Avaliar hepatotoxicidade por meio da dosagem de marcadores enzimáticos (ALT – AST).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DOS ANIMAIS

Para o estudo, foram utilizados camundongos da linhagem Swiss, preferencialmente fêmeas, obtidos e mantidos nas dependências do Biotério do Centro de Pesquisas René Rachou. Um total de 136 animais foram separados em diferentes grupos de tratamentos. A avaliação da ação esquistossomicida sobre os animais infectados foi realizada após 7 dias do tratamento, por meio da eutanásia dos animais. Os grupos de animais que foram infectados receberam aproximadamente 80 ± 10 cercárias/animal.

3.2 ACOMPANHAMENTO CLÍNICO DIÁRIO DOS ANIMAIS

Foi realizado o monitoramento clínico diário para atestar o bem-estar animal ao longo de todo o período do experimento e também no “*end point*” do experimento (momento este que o animal apresenta um sinal ou conjunto de determinados sinais que indicam que entrará em sofrimento e, portanto, será retirado do experimento ou submetido à eutanásia). Para monitoramento de sinais, sintomas clínicos e determinação de “*end point*” de cada animal, os seguintes parâmetros foram avaliados: atividade motora geral (foi verificado se o animal apresentava posição normal de membros anteriores e posteriores, estado de atenção normal, ausência de corpo arqueado, ausência de andar cambaleante, locomoção normal); posição dos membros posterior (os membros posteriores devem estar sustentando o animal, devem estar hígidos com ausência de paralisia ou fraqueza que impeça o animal de se locomover), sinais de dor (notado com a expressão facial com olhos e focinhos contraídos, orelhas baixas, postura arqueada); afastamento do grupo, quieto, pelo arrepiado e se apresentava emagrecimento. Em caso de alguma alteração de anormalidade do comportamento habitual da espécie, com alteração de alimentação e ingestão de água, o mesmo seria pesado e caso seu peso corporal apresentasse redução de 20% de seu peso inicial, este animal seria encaminhado para eutanásia. A observação diária foi realizada com auxílio da equipe de técnicos do biotério. O registro de acompanhamento dos animais foi feito em um caderno do laboratório específico para estes registros. O comportamento habitual da espécie e a frequência de alimentação e ingestão de água foram acompanhados.

3.3 ENSAIOS *IN VIVO*, TRATAMENTO E AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA DOS ANIMAIS.

Os ensaios *in vivo* foram realizados em dois esquemas de infecção, um referente a 30 dias pós infecção e outro em 45 dias pós infecção.

Inicialmente os camundongos foram divididos em 5 grupos (tabela 1), incluindo um grupo controle de infecção composto por animais não tratados e não infectados (G1), um grupo controle composto por animais infectados e não tratados (G2) e um controle de tratamento, no qual os animais infectados receberam por via oral uma dose única de PZQ 400mg/kg de peso (G3). Para avaliação do efeito do tratamento

em vermes jovens, após 30 dias da infecção um grupo recebeu duas doses no decorrer de 24 horas de tiabendazol 50mg/kg (G4) e outro tiabendazol 100mg/kg (G5) por via oral.

Outros camundongos foram também divididos nos mesmos cinco grupos descritos acima, porém, o tempo de infecção avaliado nesses grupos foi de 45 dias pós infecção, período este necessário para avaliar o efeito do tratamento em vermes adultos. As doses administradas foram calculadas conforme o peso individual de cada animal.

Após 30 ou 45 dias de infecção, os animais receberam as doses das formulações, administradas num volume máximo de 0,2 ml usando-se seringa de insulina acoplada a uma agulha especial para gavagem, em aço inox, com ponta arredondada, de 3 cm de comprimento e 1,2mm de diâmetro, permitindo que o líquido seja injetado gentilmente diretamente no estômago do animal.

Para avaliação da ação esquistossomicida, após os respectivos períodos de infecção e tratamentos, os camundongos foram anestesiados com a mistura de Cloridrato de Quetamina 5% (75 e 200 mg/Kg) e Cloridrato de Xilazina 2% (5 a 16mg/Kg) via intraperitoneal no quadrante lateral inferior direito, usando agulhas 26G ½" (0,45 X 13 mm). Após anestesiado, alíquotas de sangue foram coletadas por punção cardíaca, seguida de eutanásia por deslocamento da coluna cervical. Os vermes, separados em machos, fêmeas ou casais, foram recuperados por perfusão e contados/agrupados conforme a localização dos mesmos (se nas veias mesentéricas ou hepáticas). Os resultados foram comparados aos obtidos no grupo G2 (controle infectado e não tratado).

Tabela 1 - Disposição dos animais nos grupos experimentais e seus respectivos esquemas de terapêuticos.

Grupo	Esquema de tratamento em mg/kg	Via	Nº animais	Esquema de doses
G1	Não tratado	-	8	-
G2	Não tratado	-	8	-
G3	400	Oral	8	Única
G4	50	Oral	8	Duas*
G5	100	Oral	8	Duas*

G1: grupo controle não infectado e não tratado; G2: grupo controle infectado e não tratado; G3: grupo controle praziquantel; G4: grupo tiabendazol 50mg/kg e G5: grupo tiabendazol 100 mg/kg. Os animais recebem o tratamento com TBZ aos 30 e 45 dias após a infecção. Para aqueles que receberam a opção de dose dupla, a segunda dose foi administrada um dia após a primeira dose.

Fonte: Elaboração própria (2022).

3.4 RECUPERAÇÃO DOS VERMES

Após eutanasiados, os vermes adultos presentes no sistema porta hepáticos dos camundongos infectados com *S. mansoni* foram recuperados, conforme descrito por Pellegrino e Siqueira (1956) para a avaliação da carga parasitária. A porcentagem de vermes recuperados foi obtida por meio da seguinte equação:

$$\% \text{ de recuperação vermes} = \frac{C - T}{C} \times 100$$

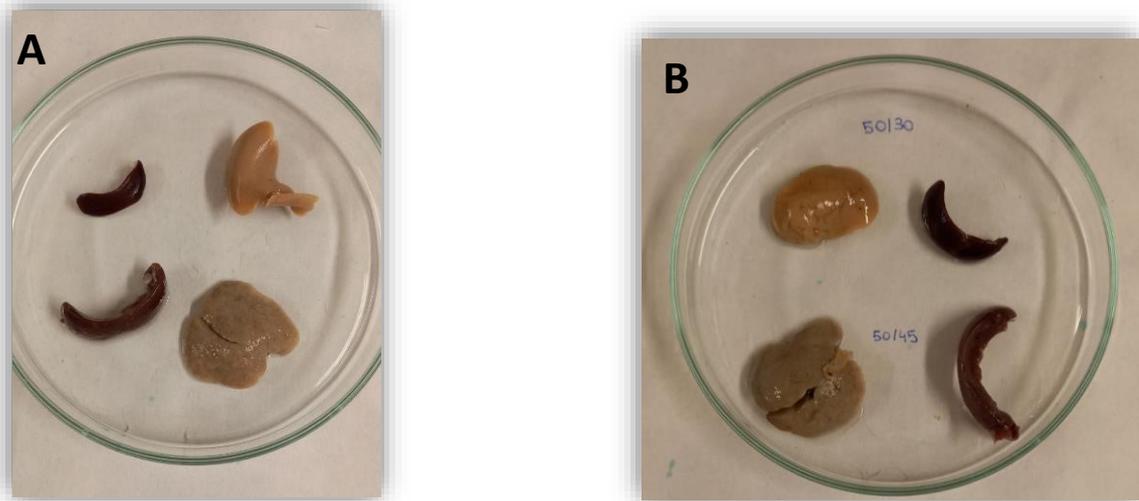
onde,

C = média do grupo controle

T = média do grupo de tratamento

3.5 PESO HEPÁTICO E ESPLÊNICO

Após eutanásia e perfusão, o fígado e baço de cada camundongo submetido ao tratamento com TBZ, bem como daqueles pertencentes aos grupos G2 e G3 foram removidos e seus pesos determinados em balança analítica.



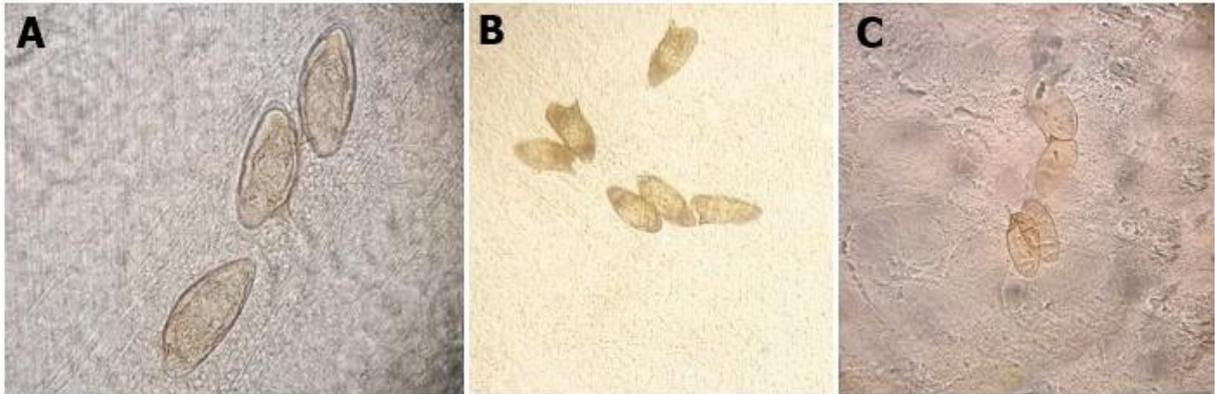
Em (A) observa-se órgãos de animais saudáveis (superior) e órgãos de animais infectados (inferior). Em (B) órgãos de grupo G4 aos 30 dias PI (superior) e órgãos de animais também do grupo G4 aos 45 dias PI (inferior).

Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 4 Fígado e Baço dos animais eutanasiados.

3.6 ANÁLISE QUALITATIVA E QUANTITATIVA DO OOGRAMA

Fragmentos do intestino delgado (íleo terminal), de 1 cm de comprimento, foram cortados de todos os animais. Posteriormente, esses fragmentos foram transferidos para placas de Petri contendo solução salina isotônica, abertas longitudinalmente com tesoura para retirada do excesso de muco, parcialmente secas em papel absorvente, e mantida pressionada entre uma lâmina de vidro e uma lamínula plástica (PELLEGRINO et al., 1962). Os ovos foram observados a fresco e qualitativamente avaliados quanto a maturidade sob microscópio óptico, conforme a Figura 5. Os ovos foram classificados como maduros, imaturos ou ovos contendo miracídios mortos. A análise quantitativa dos oogramas foi realizada com a análise de 50 ovos em cada animal sendo o resultado expresso em porcentagem.



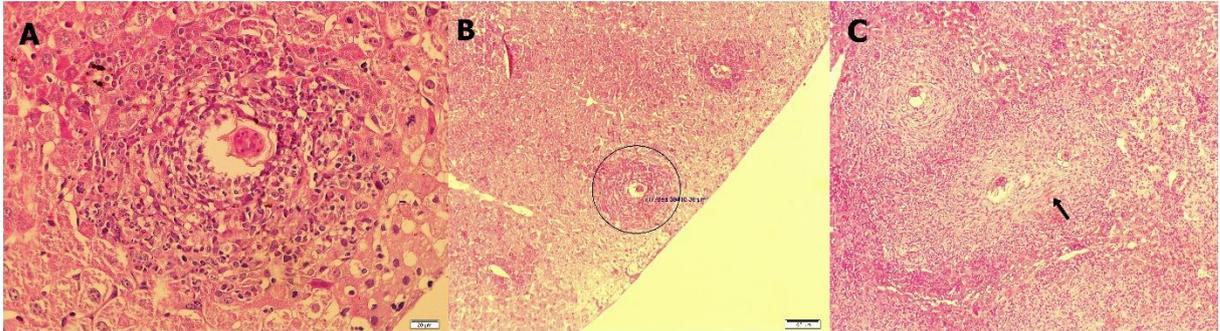
Em (A) ovos maduros, (B) ovos imaturos e em (C) ovos contendo miracídios mortos.
 Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 5 - Aspectos gerais dos ovos de *S. mansoni* recuperados na análise qualitativa do oograma.

3.7 AVALIAÇÃO DAS ÁREAS GRANULOMATOSAS

Fragmentos do fígado foram fixados em solução de formol a 10% tamponado a PBS para estudo histológico. Assim, as amostras de fígados foram processadas em blocos de parafina, seccionadas (4 μ m de espessura) e coradas com hematoxilina-eosina (HE) para medir a área do granuloma (PYRRHO et al., 2002). As lâminas foram analisadas usando microscópio óptico Olympus BX41 e escaneadas usando uma câmera de vídeo Olympus DP72 acoplada ao microscópio. A área total dos granulomas foi medida e os resultados expressos em micrometros quadrados (μ m).

Foram medidos os granulomas viáveis contendo um único ovo central encontrados em 15 campos aleatórios de baixo aumento (10 x) para cada animal (n=5) dos grupos G4 e G5 referentes a 30 dias e 45 dias pós infecção. Para os grupos G2 e G3 foram analisadas duas lâminas (n=2) também nos respectivos dias 30 e 45 pós infecção.



As imagens foram fotografadas com microscópio Olympus BX41. Objetiva utilizada: (A) 40 x, (B) e (C) 10 x. Os granulomas são correspondentes a fase aguda de infecção. Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 6 - Fotomicrografias de áreas de granulomas hepáticos em cortes histológicos corados com hematoxilina-eosina (HE). Foram medidas 15 áreas/campos/animal contendo um único ovo bem central no granuloma. Em (A) granuloma com um ovo bem definido ao centro. Em (B) a circunferência delimita área do granuloma utilizada nas mensurações e em (C) corte histológico contendo dois granulomas com ovos próximos, impossibilitando a delimitação da área.

3.8 DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-SEA e ANTI-SWAP NO SORO DOS ANIMAIS POR ELISA

O teste utilizado para detecção de anticorpos contra os antígenos presente no soro dos camundongos foi o ELISA indireto. Soro de animais (n=2) de cada grupo em estudo foram utilizados em duplicata.

Primeiramente, solubilizou-se o antígeno (SEA ou SWAP) em tampão carbonato/bicarbonato de sódio (NaHCO_3) 0,1M pH9,6 para adsorção em microplacas de 96 poços, durante 1 hora a 4°C. Em seguida essas placas foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato acrescido em tween 20 0,05% (PBS T); pH7,2 e bloqueadas por 1 hora com solução de leite desnatado (5%).

Após o bloqueio, as placas foram novamente lavadas e incubadas com 20 µl de soro + 180 µl PBS. Os anticorpos primários são os soros dos animais. Foram utilizadas diluições seriadas de 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 e 1/1280; e incubadas por mais 1 hora e 30 minutos.

Após lavagem com tampão PBS T, foram adicionados 100 µl/poço de anticorpo secundário anti IgG de camundongos conjugados com peroxidase na diluição de 1:15000. Novamente as placas foram incubadas por 1 hora e logo após lavadas com tampão fosfato acrescido em tween 20 0,05% (PBS T); pH7,2.

Por fim, foi adicionado 100 µl/poço de reagente de cor. A solução de revelação foi preparada com OPD (ortofenilenodiamina) e água oxigenada diluídas em tampão citrato pH 5,6. Quando se observou na placa uma mudança gradativa de cor no poço contendo a amostra de controle respectiva ao grupo G1, a reação foi pausada com a solução de ácido sulfúrico 2N. Após, foi realizado a leitura em leitor ELISA (SpectraMax 190) na absorvância de 492 nm.

3.9 ENSAIO DOS MARCADORES ENZIMÁTICOS DE HEPATOTOXIDADE

Os biomarcadores séricos que avaliam a atividade hepática foram analisados utilizando-se a dosagem das enzimas alanina aminotransferase (AST) e aspartato aminotransferase (ALT). Para essa análise foi utilizado o soro dos animais (n=5), seguindo as instruções dos fabricantes dos kits comerciais transaminases Bioclin.

O valor do cut off representa o ponto médio para que um soro venha a ser considerado positivo ou negativo. Quando um soro teste apresenta um valor de absorvância acima do determinado no cut off considera-se o resultado positivo, mas se o resultado estiver abaixo do valor do cut off então o animal é considerado negativo.

Os valores de referência dados pelos fabricantes, em U mL⁻¹ foram obtidos através da determinação do ALT e AST em populações sadias:

AST: 4 a 36 unidades/ mL

ALT: 4 a 32 unidades/ mL

As dosagens de AST e ALT foram expressas em unidades (U mL⁻¹). Os resultados foram examinados em espectrofotômetro a 505 nm, de acordo com as instruções do fabricante.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada análise estatística descritiva para expor os resultados obtidos utilizando-se os *softwares Excel v. 2016*. A apresentação das variáveis mensuradas foi feita através de tabelas e gráficos, incluindo o uso de algumas medidas descritivas como média aritmética e desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os tratamentos e os controles foram testadas por análise de variância (ANOVA) com pós teste de *Tukey's*. Nos experimentos correspondentes a recuperação dos vermes, análise das áreas dos granulomas, ensaio de hepatotoxicidade e peso dos órgãos foi realizado a análise *ordinary one-way*. Na análise do oograma foi realizado análise *one way* e no ensaio de ELISA foi utilizado a análise *two-way*. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o programa *GraphPad Prism 8* e os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

3.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

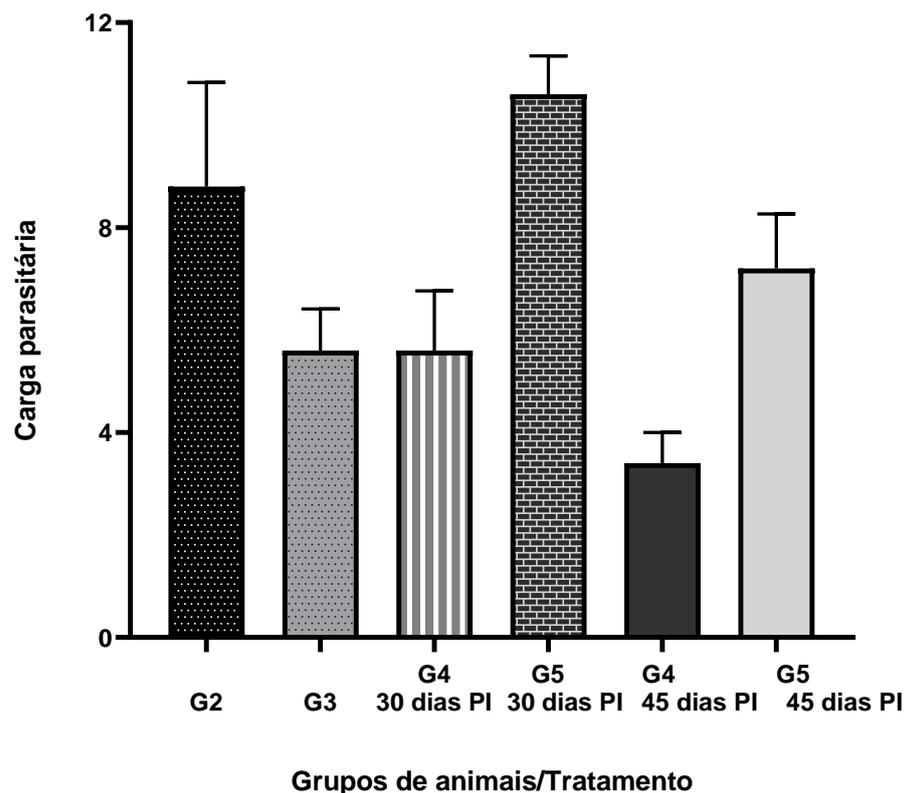
Este estudo faz parte do projeto de pesquisa intitulado como “Avaliação do potencial terapêutico do tiabendazol para tratamento da esquistossomose mansoni experimental”, o qual possui autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Fiocruz, protocolo nº 26/21-3, para a manipulação de camundongos em laboratório com a sua respectiva licença LW-32/21 (ANEXO A).

4 RESULTADOS

4.1 PRIMEIRO EXPERIMENTO

4.1.1 Avaliação da atividade esquistossomicida

O projeto foi realizado em dois períodos de tratamentos. A primeira análise foi feita com os animais 30 dias pós infecção. Como apresentado na figura 7 e tabela 2, a média de vermes adultos recuperados pela perfusão revelou que o número de vermes foi maior no grupo G5 ($10,60 \pm 1,67$), quando comparado aos outros grupos (G2 $8,80 \pm 4,55$; G3 $5,6 \pm 1,82$ e G4 $5,6 \pm 2,61$). A análise da redução da carga parasitária não foi estatisticamente significativa.



Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 7 - Avaliação da carga parasitária dos animais tratados com tiabendazol 30 e 45 dias após a infecção. Os vermes adultos foram recuperados por perfusão de camundongos Swiss experimentalmente infectados por *S. mansoni* submetidos ao tratamento com praziquantel, tiabendazol 50 mg/kg e tiabendazol 100 mg/kg.

Tabela 2 - Avaliação da carga parasitária recuperada de camundongos Swiss infectados com *S. mansoni* e submetidos a diferentes terapias farmacológicas.

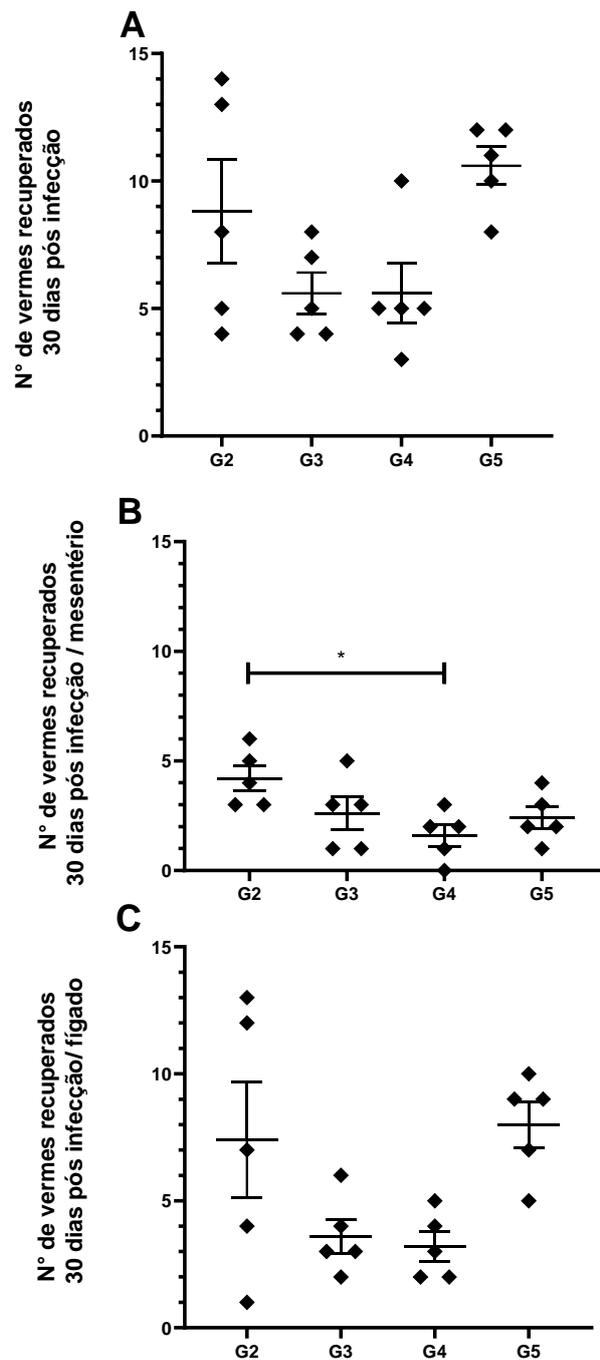
Grupos (n=5)	Média dos vermes	Mesentério	Fígado	% Redução da carga parasitária
G2	8,80 ± 4,55	4 ± 1,58	4,8 ± 4,87	---
G3	5,6 ± 1,82	1,6 ± 1,34	4,0 ± 2,35	36,36%
G4 30 dias PI*	5,6 ± 2,61	1,6 ± 1,14	4,0 ± 2,24	36,37%
G5 30 dias PI*	10,60 ± 1,67	2,6 ± 1,52	8,0 ± 2,0	---
G4 45 dias PI*	3,4 ± 1,34	2,0 ± 2,12	1,4 ± 0,89	Erro
G5 45 dias PI*	7,2 ± 2,39	1,8 ± 1,48	5,4 ± 2,3	Erro

PI* Pós infecção.

Fonte Elaboração própria (2022).

Em relação a recuperação dos parasitos por porção (mesentérica e fígado), a maior recuperação de parasitos foi encontrada na porção do mesentério dos animais do grupo G2 (figura 8-B), já na porção do fígado (figura 8- C), a maior recuperação de parasitos foi relacionada ao grupo G5, já a menor foi relativa ao grupo G3. Foi possível observar uma maior tendência de deslocamento dos vermes para a porção hepática com todos os tratamentos. Houve diferença significativa, com redução da carga parasitária no grupo G4 aos 30 dias de infecção. Apesar da redução da carga parasitária ser similar nos dois grupos G3 e G4, não houve diferença significativa no grupo G3 aos 30 dias pós-infecção (figura 8-B).

Em 45 dias pós infecção foram analisados apenas os grupos de tratamento de G4 e G5. Desta forma a ausência dos grupos G2 e G3, impediu a comparação dos dados e a realização da análise estatística.



Em (A) número total de vermes recuperados por grupo, em (B) recuperação dos vermes da porção do mesentério e em (C) recuperação dos vermes da porção do fígado. As diferenças significativas estão apresentadas pelos valores de p (*); $p < 0,05$: redução da média de vermes recuperados do grupo infectado com o grupo TBZ 50 mg/kg. Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 8- Número de vermes adultos recuperados dos animais infectados e tratados ($n=5$) com os compostos PZQ e TBZ 50mg/kg e TBZ 100 mg/kg 30 dias pós infecção.

4.1.2 Peso hepático e esplênico

Como retratado na tabela 3 e figura 9, houve alteração nos valores médios dos pesos dos órgãos após o tratamento com TBZ. Analisando os valores das medidas de peso do baço e peso do fígado dos diferentes grupos, foi possível perceber diferenças estatísticas entre os grupos. Ao observar a figura 9, nota-se que o grupo G2 apresentou uma média maior de peso do fígado entre seus animais ($3,5 \pm 0,5$) e também uma média maior do baço ($0,6 \pm 0,1$) quando comparado aos outros grupos de estudo.

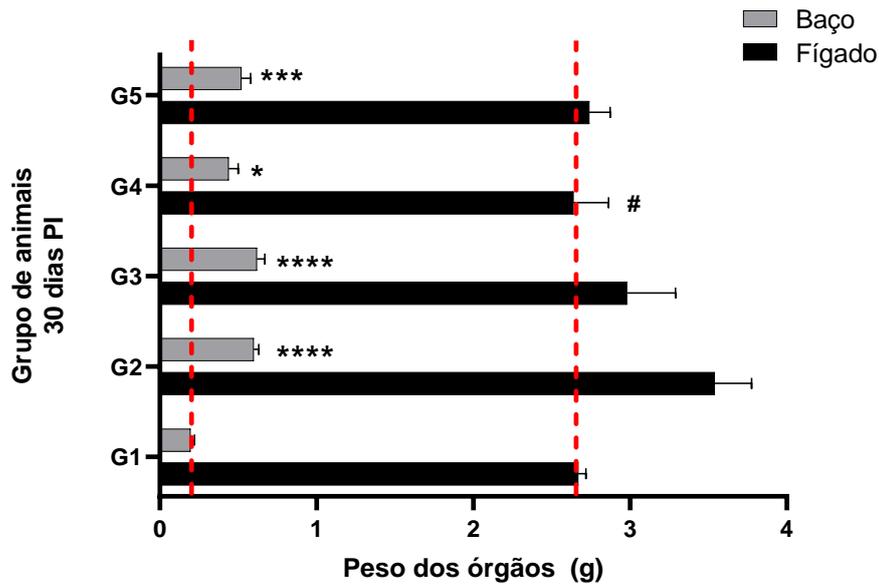
Tabela 3 - Peso médio dos órgãos removidos (fígado e baço) dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por *S. mansoni*. O tratamento foi iniciado aos 30 dias após a infecção.

Grupos	Órgãos (g)	
	Baço	Fígado
G1	$0,2 \pm 0,05$	$2,6 \pm 0,1$
G2	$0,6 \pm 0,1$ ****	$3,5 \pm 0,5$
G3	$0,6 \pm 0,1$ ****	$2,8 \pm 0,4$
G4	$0,4 \pm 0,1$ *	$2,6 \pm 0,5$ #
G5	$0,5 \pm 0,1$ ***	$2,7 \pm 0,3$

Diferenças estatísticas em relação ao controle sadio (não infectado e não tratado) (*) $P < 0,05$; (***) $P < 0,001$; (****) $P < 0,0001$

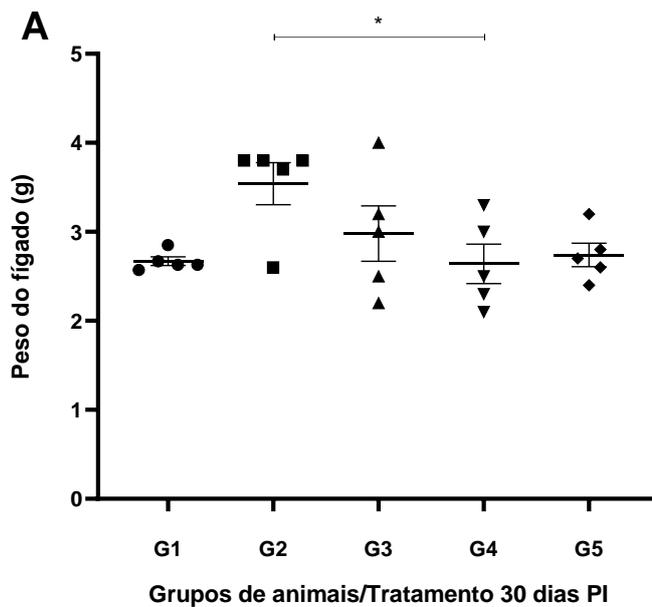
(#) Diferença estatística em relação ao animal infectado e não tratado $P < 0,05$.

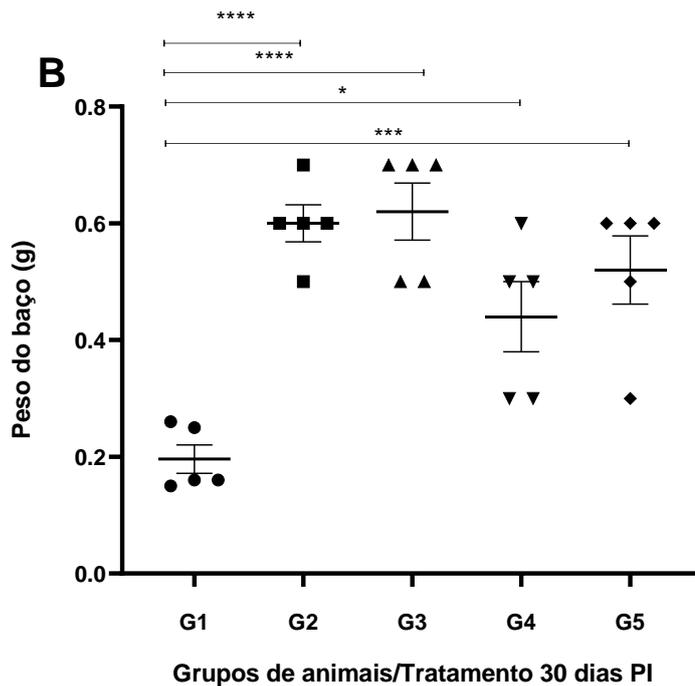
Fonte: Elaboração própria (2022).



Os animais iniciaram seu tratamento 30 dias após a infecção. (*) Diferenças estatísticas do peso do baço em relação ao grupo G1 com os grupos G2, G3, G4 e G5 $p < 0,05$. (#) Diferença estatística do peso do fígado do grupo G2 em relação ao grupo G4 $p < 0,05$.
 Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 9 - Representação gráfica do peso médio do fígado e baço de camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados com praziquantel e tiabendazol aos 30 dias PI.





Os órgãos foram removidos dos animais que foram tratados 30 dias após a infecção. Em (A) o peso referente ao fígado e em (B) peso do baço. Em (A), (*) diferença estatística em relação ao grupo G2 e G4 p (<0,05). (B); diferença estatística em relação ao G1 com os grupos G2, G3, G4 e G5. (*) p <0,05; (***) p <0,001; (****) p <0,0001. Não houve diferença estatística relevante em relação ao grupo G2 com os demais grupos. Fonte: Elaboração própria (2022).

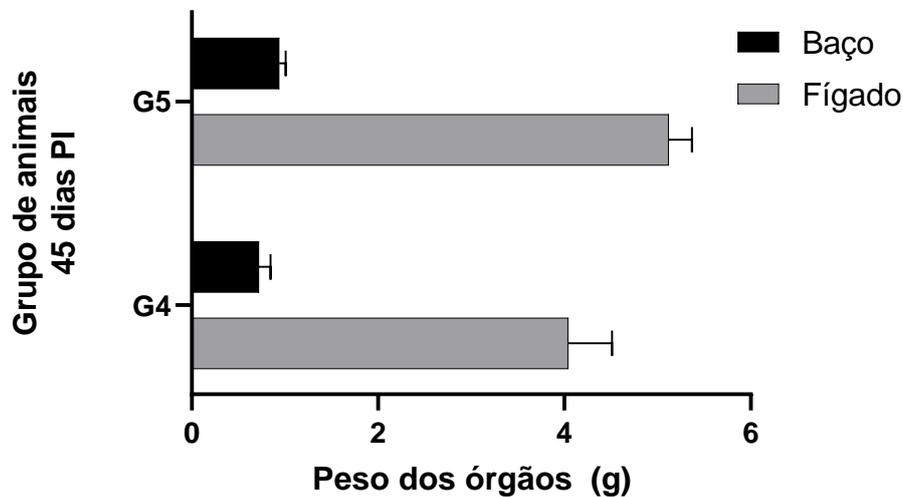
Figura 10 - Representação gráfica do peso individual dos órgãos removidos (fígado e baço) dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por *S. mansoni* aos 30 dias PI.

No ensaio realizado aos 45 dias pós infecção, também houve diferença na média dos pesos hepáticos e esplênicos como retratado na tabela 4 e nas figuras 11 e 12. O grupo G5 apresentou uma média (baço: $0,9 \pm 0,2$; fígado: $5,1 \pm 0,6$) maior do peso dos órgãos quando comparado ao grupo G4 (baço: $0,7 \pm 0,3$; fígado: $4,0 \pm 1,1$). A ausência dos grupos G2 e G3, impediu a comparação dos dados.

Tabela 4 - Peso médio dos órgãos removidos (fígado e baço) dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por *S. mansoni*. O tratamento foi iniciado aos 45 dias após a infecção.

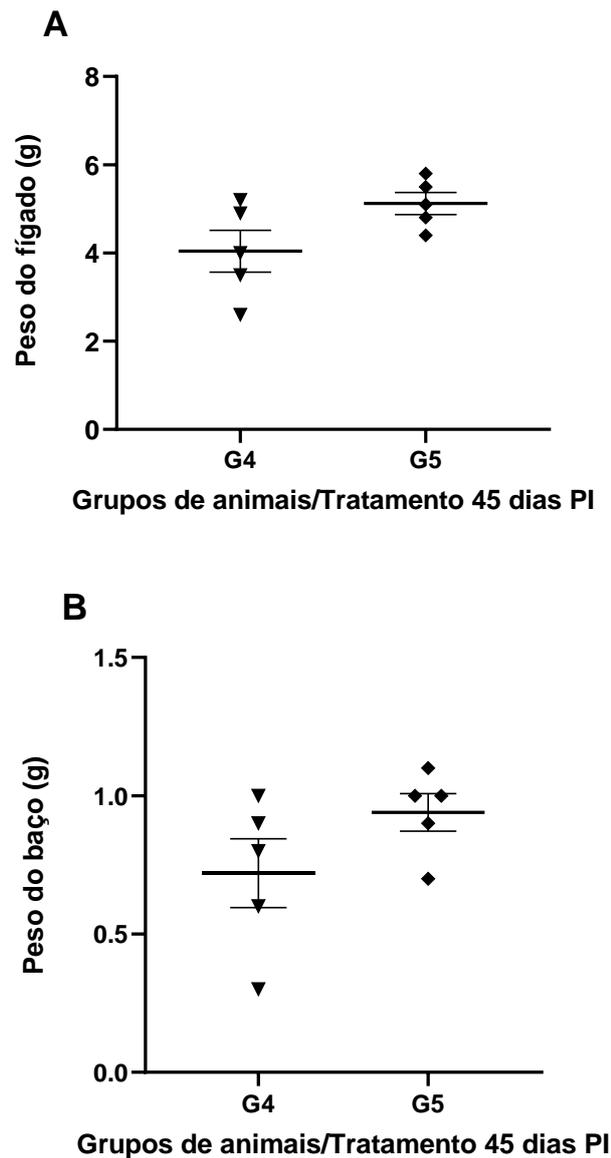
Grupos	Órgãos (g)	
	Baço	Fígado
G4	0,7 ± 0,3	4,0 ± 1,1
G5	0,9 ± 0,2	5,1 ± 0,6

Fonte: Elaboração própria (2022).



Os animais iniciaram seu tratamento 45 dias após a infecção.
Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 11 - Representação gráfica do peso médio dos órgãos removidos (fígado e baço) dos grupos de tratamento TBZ 50 mg/kg e TBZ 100 mg/kg após eutanásia dos animais infectados por *S. mansoni*.



Os animais iniciaram o tratamento 45 dias após a infecção. Em (A) o peso referente ao fígado e em (B) peso do baço.

Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 12 - Representação gráfica do peso individual dos órgãos removidos (fígado e baço) dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por *S. mansoni*.

4.1.3 Avaliação quali-quantitativa do oograma

Com o intuito de analisar o efeito do tratamento do tiabendazol sobre o desenvolvimento dos ovos, foi realizada uma análise quali-quantitativa do oograma do

fragmento intestinal dos camundongos dos diferentes grupos de tratamento. Inicialmente foi proposto a contagem de 50 ovos viáveis em cada fragmento intestinal, entretanto, no período de 30 dias PI apenas o grupo G2 apresentou esta média quantitativa de ovos, os demais grupos apresentaram valores inferiores, como observado na tabela 5.

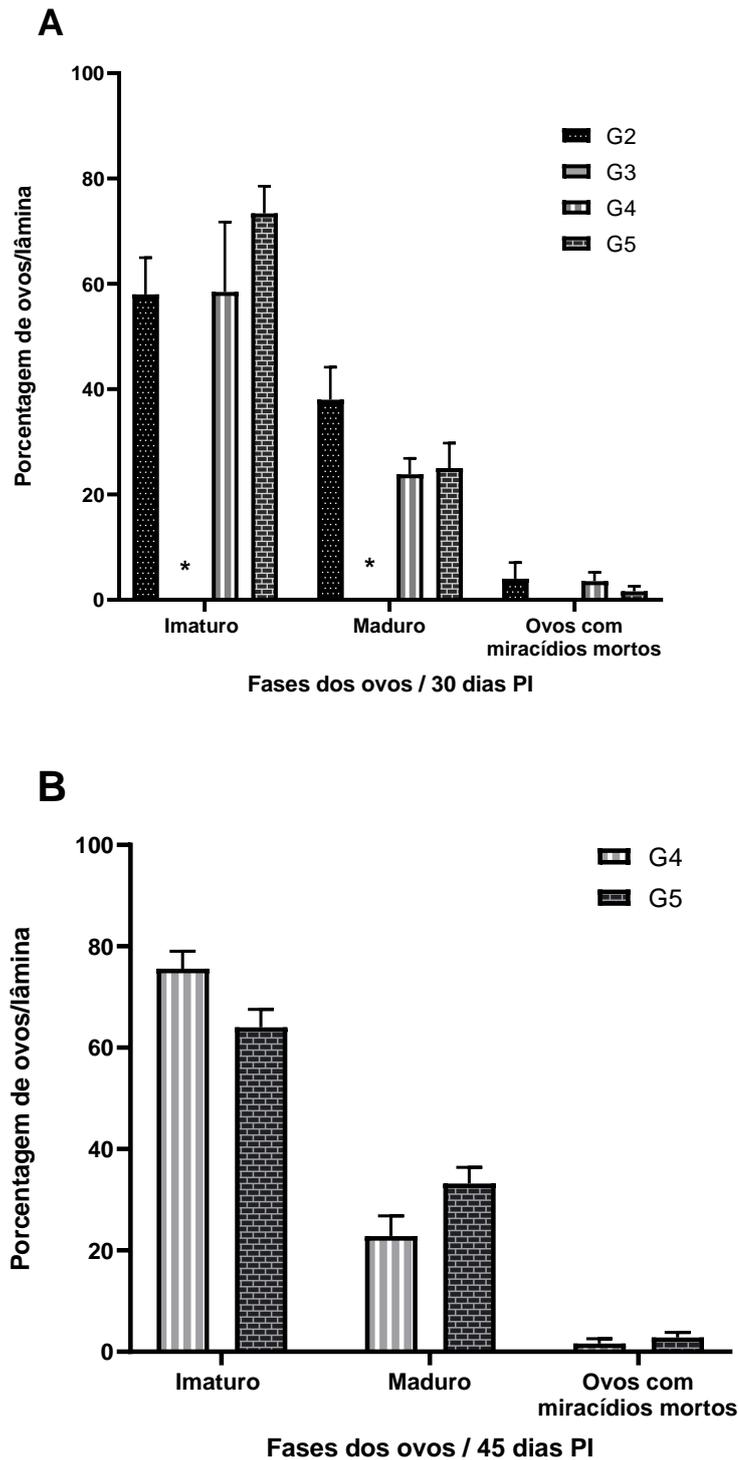
Realizando uma análise dos fragmentos intestinais, observa-se que os grupos tratados com TBZ em ambas dosagens, tanto no período de 30 e 45 dias pós infecção, evidenciaram a presença de todos os estágios de desenvolvimento dos ovos, como observado na figura 13. Já o grupo G3 não apresentou ovos em nenhum estágio de desenvolvimento no período de 30 dias PI. Para esse ensaio não foi analisado o período de 45 dias PI. Houve diferença estatística no período de 30 dias PI em relação ao grupo G2 com o grupo G3.

A análise qualitativa e quantitativa do oograma revelou que os grupos apresentaram grande quantidade de ovos imaturos sugerindo que até o momento da análise estava ocorrendo a oviposição.

Tabela 5 - Média dos números de ovos imaturos, maduros e contendo miracídios mortos em fragmento da porção íleo-terminal do intestino dos camundongos nos diferentes grupos de tratamentos no período de 30 e 45 dias PI.

Grupos de tratamento (n=5)	ESTAGIO DE DESENVOLVIMENTO DOS OVOS					
	30 DIAS PÓS INFECÇÃO			45 DIAS PÓS INFECÇÃO		
	Imaturo	Maduro	Ovos com miracídios mortos	Imaturo	Maduro	Ovos com miracídios mortos
G2	29 ±7	19 ±6,2	1 ± 3,2	-	-	-
G3	0 ****	0***	0	-	-	-
G4 #	33,7 ± 10,2	15 ± 9,7	1,25 ± 1,9	37,8 ± 3,8	11,4 ± 4,5	0,8 ±1,1
G5	34,8 ± 7,2	11,8 ± 5,3	0,8 ± 1,1	32 ± 4	16,6 ± 3,5	1,4 ±1,1

Foram contados 50 ovos/lâmina, empregando lâminas de 5 animais distintos
Diferença estatística em relação ao grupo G2 com G3; (****) p <0,0001; (***) p< 0,001. (#)
TBZ 50 mg/kg (n=4) Fonte: Elaboração própria (2022).



Em (A) quantidade de ovos em 30 dias pós infecção e em (B) quantidade de ovos em 45 dias pós infecção. (*) diferença estatística em relação ao grupo G2 com G3.

Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 13 - Percentual de ovos imaturos, maduros e ovos contendo miracídeos mortos em fragmento da porção íleo-terminal do intestino dos camundongos tratados com tiabendazol.

4.1.4 Detecção de anticorpos no soro dos animais por ELISA

Com o propósito de conhecer a resposta imune dos camundongos frente a infecção com *S. mansoni* tratados com TBZ, foram mensuradas a produção de anticorpos contra os antígenos SEA (antígeno solúvel do ovo) e SWAP (antígeno solúvel de verme adulto) nos soros dos animais.

Todos os grupos em estudo revelaram a produção de anticorpos frente aos dois antígenos em ambos períodos de infecção.

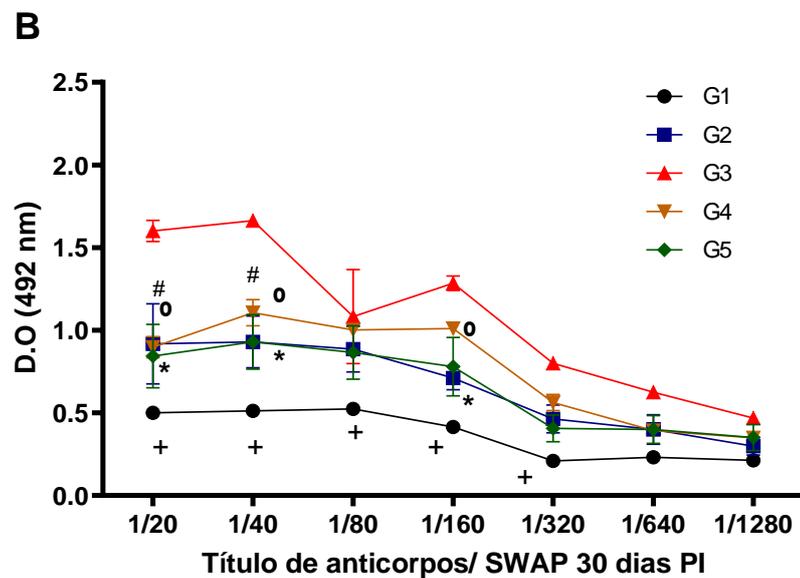
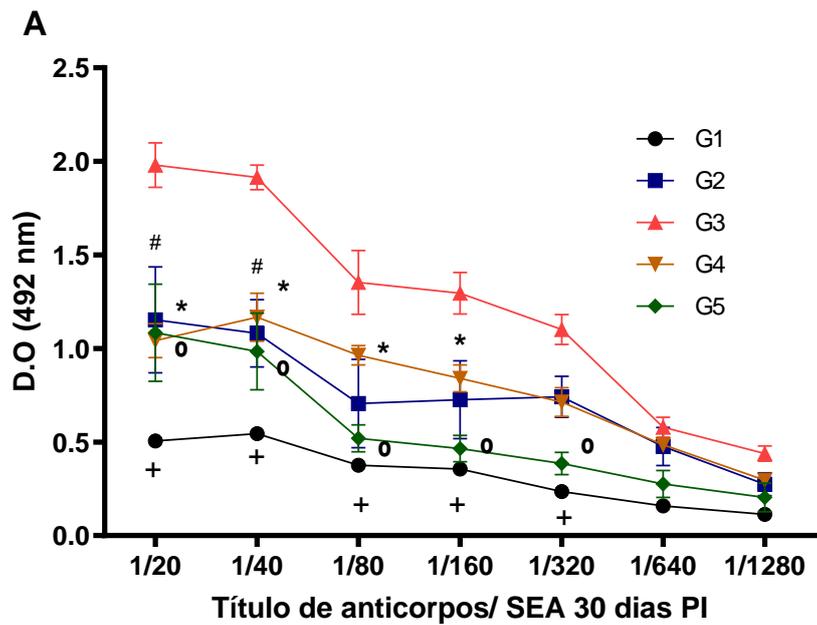
Conforme figura 14, a concentração sérica de anticorpos contra antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) e de ovos (SEA) do grupo G3 foi mais elevada que os outros grupos de tratamento.

Os animais do grupo G3 mostraram reatividade de anticorpos em níveis significativamente superior aos animais do grupo G1 quando empregada a preparação SEA até a diluição 1/320 ($p < 0,0001$), em relação ao grupo G2 esse nível foi até a diluição 1/160 ($p < 0,01$).

Os níveis de anticorpos reativos com a preparação SEA dos animais tratados com PZQ foram superiores aos níveis de anticorpos detectados nos grupos G4 (1/40) e no G5 (1/320) $p < 0,001$.

Ao observar a figura 14- B, quando empregado a preparação SWAP, os animais do grupo G3 mostraram reatividade de anticorpos em níveis significativamente superior ao grupo G1 até a diluição 1/320 ($p < 0,01$); e em relação ao grupo G2 da diluição 1/20 a 1/40 e a diluição 1/160 ($p < 0,01$).

Os níveis de anticorpos reativos também foram superiores aos níveis de anticorpos detectados nos animais dos grupos G4 (1/40) e com o G5 diluição 1/20 a 1/40 e a diluição 1/160 ($p < 0,01$).



As diferenças estatísticas estão representadas: (+) diferença em relação ao G1 e G3; (*) diferença em relação ao G3 e G2; (#) diferença em relação ao G3 e G4; (°) diferença em relação ao G3 e G5.

Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 14- Avaliação da presença de anticorpos contra os antígenos SEA e SWAP em camundongos infectados com *S. mansoni* referente ao período de 30 PI. Em (A) refere ao antígeno SEA. E em (B) antígeno SWAP.

No período de 45 dias PI, a ausência dos grupos controles G1, G2 e G3 impossibilitaram a realização do ensaio e posteriores análises estatísticas.

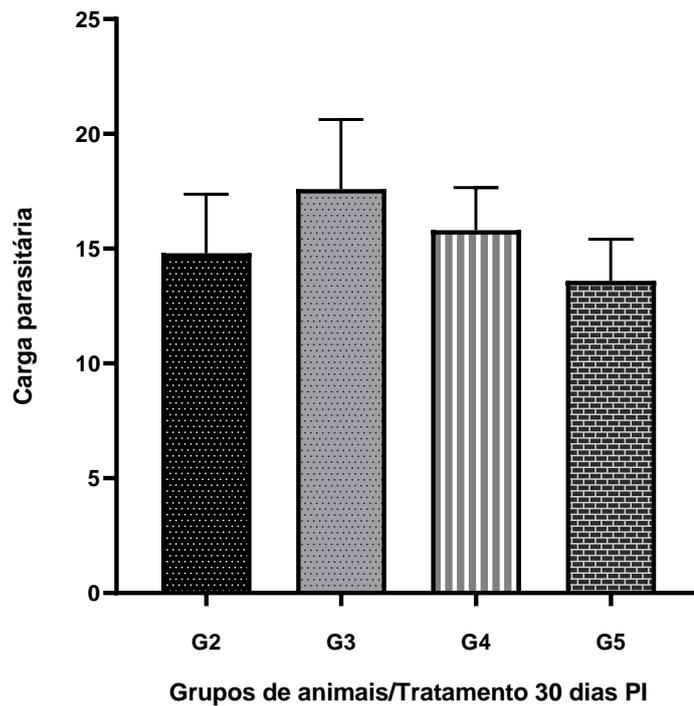
4.2 SEGUNDO EXPERIMENTO

O segundo experimento foi realizado nas mesmas condições do primeiro. Todas as metodologias descritas foram feitas bem como a presença de todos os grupos de animais nos períodos de tratamento de 30 e 45 PI.

4.2.1 Avaliação da atividade esquistossomicida

A média de vermes adultos recuperados após perfusão realizada aos 30 dias PI, como apresentado na figura 15 e tabela 6, revelou que foi maior para o grupo G3 ($17,6 \pm 6,77$), quando comparado aos outros grupos (G2 $14,80 \pm 5,76$; G4 $15,80 \pm 4,15$ e G5 $13,6 \pm 4,04$). Estatisticamente, a análise da carga parasitária para este experimento não foi significativa.

Em relação a recuperação dos parasitos por porção (mesentérica e fígado), a maior recuperação de parasitos foi encontrada na porção do mesentério dos animais do grupo G4 (figura 16-B) e uma menor média de coleta dos parasitos referente ao grupo G2. Na porção do fígado (figura 16- C), a maior recuperação de parasitos foi relacionada ao grupo G2, e a menor média foi vista pelo grupo G5. Houve um maior deslocamento dos vermes para a porção hepática referente ao grupo G2. Houve diferença significativa no período de 30 dias PI. A redução da carga parasitaria foi vista no grupo G5 aos 30 dias de infecção.



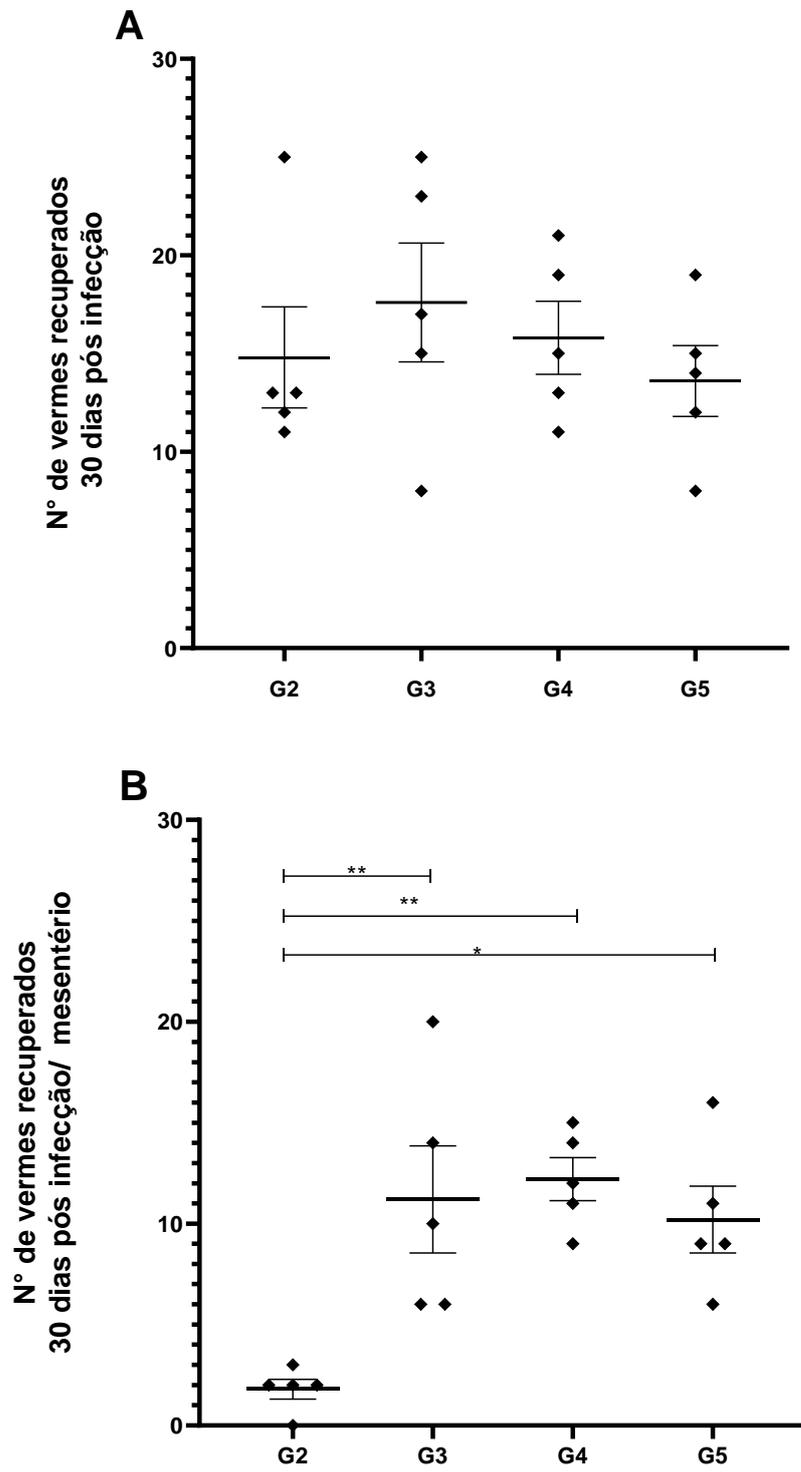
Fonte: Elaboração própria (2022).

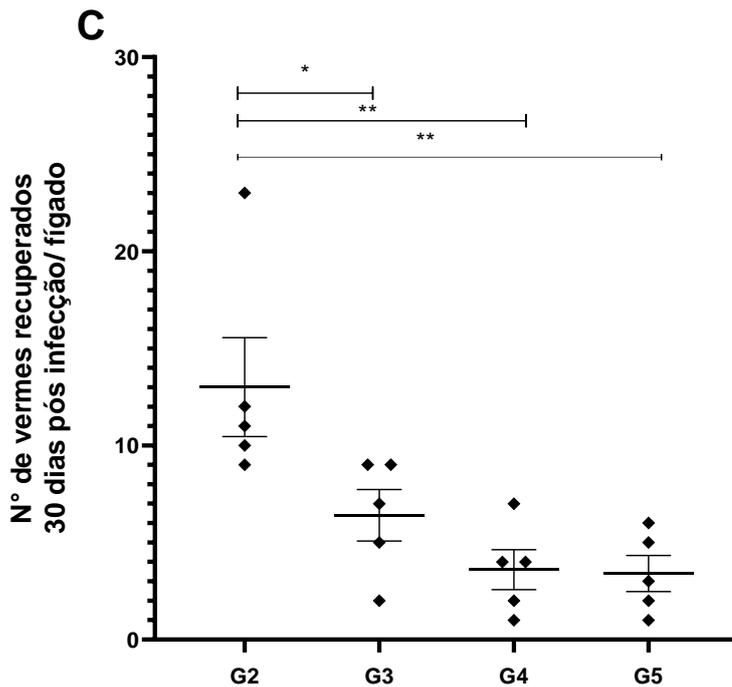
Figura 15 - Avaliação da carga parasitária dos animais tratados com tiabendazol 30 dias após a infecção. Vermes adultos foram recuperados por perfusão de camundongos Swiss experimentalmente infectados por *S. mansoni* submetidos ao tratamento com praziquantel, tiabendazol 50 mg/kg e tiabendazol 100 mg/kg.

Tabela 6 - Avaliação da carga parasitária recuperada de camundongos Swiss infectados com *S. mansoni* e submetidos a diferentes terapias farmacológicas em 30 dias PI.

Grupos (n=5)	Média dos vermes	Mesentério	Fígado	% Redução da carga parasitária
G2	14,8 ± 5,76	1,8 ± 1,10	13,0 ± 5,7	---
G3	17,6 ± 6,77	11,2 ± 5,93 *	6,4 ± 2,97*	---
G4 30 dias PI	15,80 ± 4,15	12,20 ± 2,39*	3,6 ± 2,3*	---
G5 30 dias PI	13,6 ± 4,04	10,2 ± 3,7*	3,4 ± 2,07*	8,1%

(*) diferenças estatísticas em relação ao grupo infectado e não tratado
 Fonte: Elaboração própria (2022).





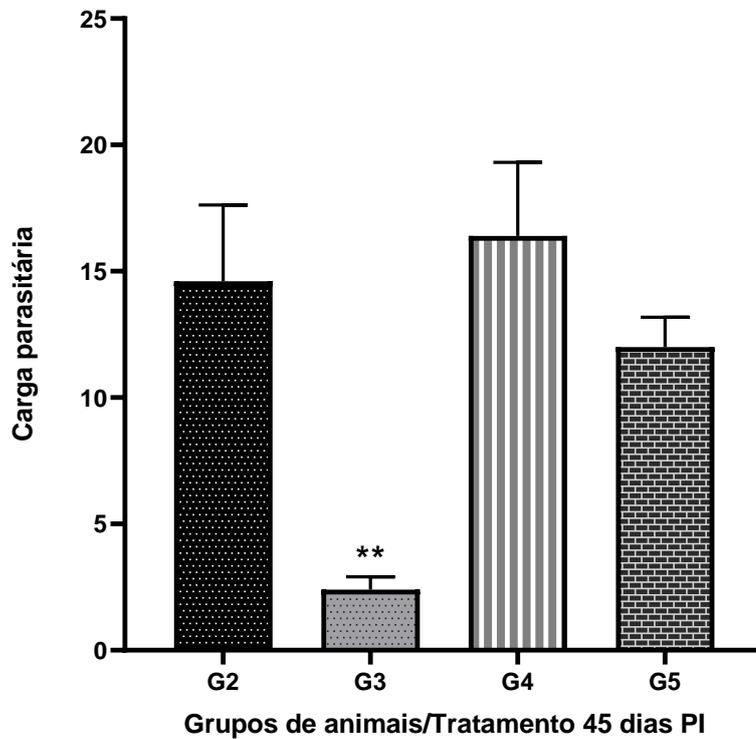
As diferenças significativas estão apresentadas pelos valores de p (*); $p < 0,05$ e (**); $p < 0,01$. As diferenças estão relacionadas com o grupo infectado e não tratado.
 Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 16 - Número de vermes adultos recuperados dos animais estudados ($n=5$) 30 dias pós infecção. Em (A) número total de vermes recuperados por grupo, em (B) recuperação dos vermes da porção do mesentério e em (C) recuperação dos vermes da porção do fígado.

A média de vermes adultos recuperados após perfusão realizada aos 45 dias PI, como apresentado na figura 17 e tabela 7 revelou que a média dos números de vermes foi maior no grupo G4 ($16,4 \pm 6,5$), quando comparado a outros grupos (G2 $14,60 \pm 6,77$; G3 $2,4 \pm 1,14$ e G5 $12,0 \pm 2,65$). Estatisticamente, houve diferença na análise da carga parasitária ($p < 0,05$) em relação ao grupo G2 com o G3

Em relação a recuperação dos parasitos por porção (mesentérica e fígado), como mostrado na figura 18, a menor recuperação de parasitos foi encontrada pelo grupo G3 em ambas as porções (porção mesentérica $0,4 \pm 0,55$; porção fígado $2,0 \pm 0,71$). A maior taxa de recuperação dos vermes da porção do mesentério foi do grupo G2 ($11,80 \pm 8,41$) já da porção do fígado foi do grupo G5 ($8,2 \pm 4,44$). Estatisticamente houve variação significativa.

O deslocamento dos parasitos da porção do mesentério para o fígado foi evidenciando apenas nos grupos G3 e G5. A redução da carga parasitária foi comprovada nos grupos G3 e G5.



A diferença significativa esta apresentada pelo valor de p (**); p (<0,01) diferença significativa em relação ao grupo G2 com o grupo G3.

Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 17 - Avaliação da carga parasitária dos animais tratados com tiabendazol 45 dias após a infecção. Vermes adultos foram recuperados por perfusão de camundongos Swiss experimentalmente infectados por *S. mansoni* submetidos ao tratamento com praziquantel, tiabendazol 50 mg/kg e tiabendazol 100 mg/kg.

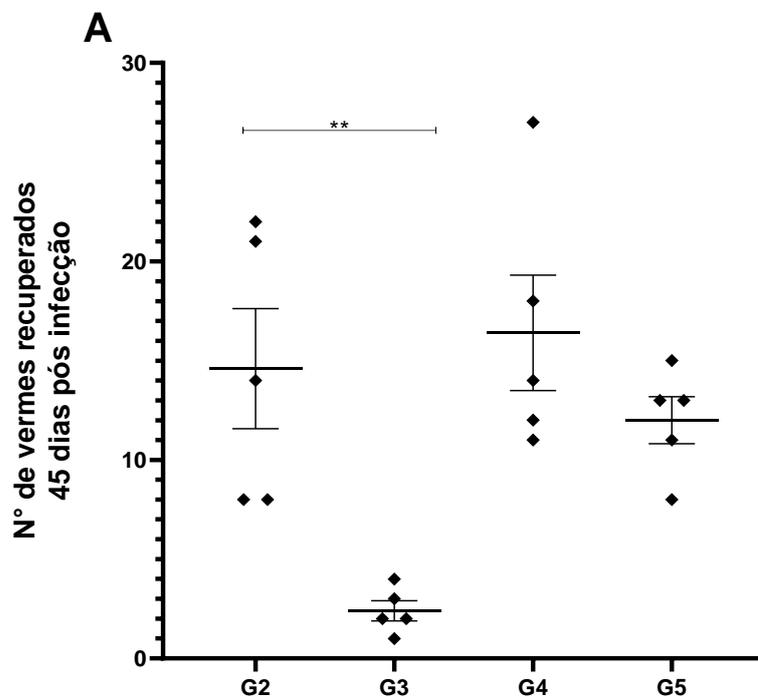
Tabela 7 - Avaliação da carga parasitária recuperada de camundongos Swiss infectados com *S. mansoni* e submetidos a diferentes terapias farmacológicas em 45 dias PI.

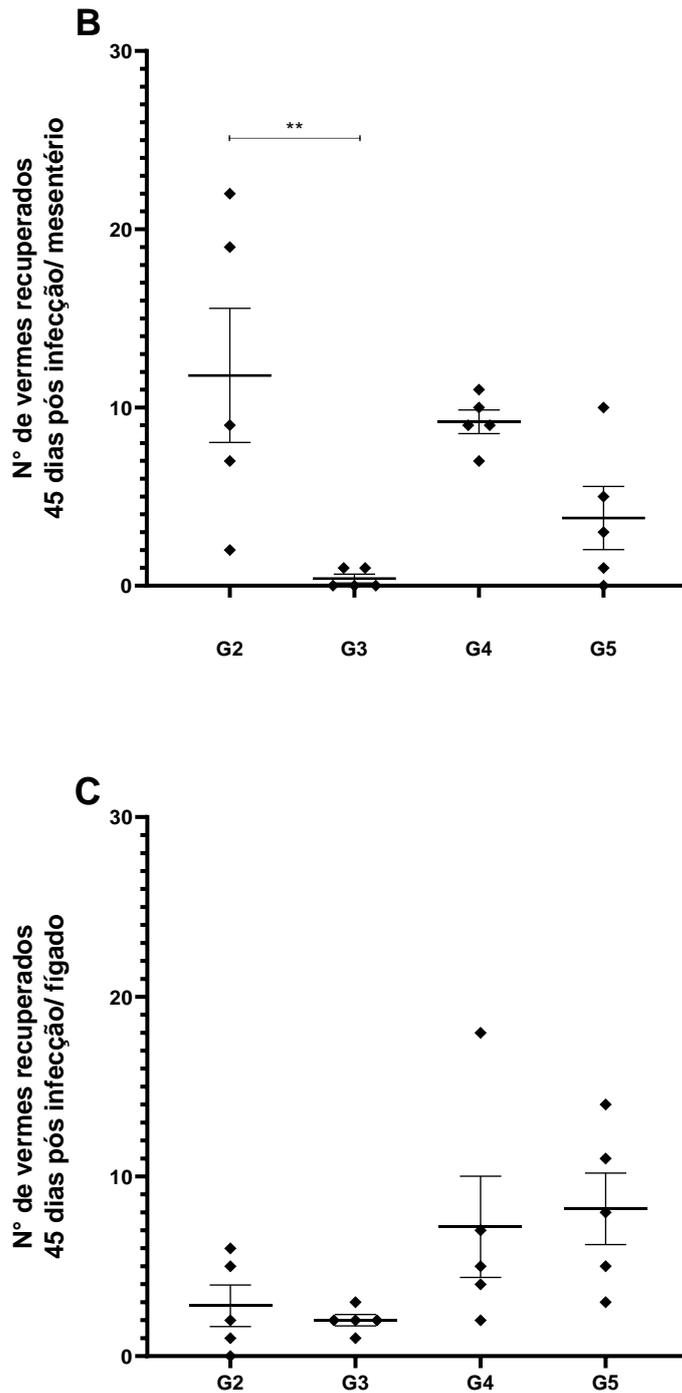
Grupos (n=5)	Média dos vermes	Mesentério	Fígado	% Redução da carga parasitária
G2	14,60 ± 6,77	11,80 ± 8,41	2,8 ± 2,59	---
G3	2,4 ± 1,14 *	0,4 ± 0,55*	2,0 ± 0,71	83,57%
G4 45 dias PI*	16,4 ± 6,5	9,2 ± 1,48	7,2 ± 6,3	---
G5 45 dias PI*	12,0 ± 2,65	3,8 ± 3,96	8,2 ± 4,44	17,8%

PI Pós infecção.

*Diferença estatística p (<0,01) em relação ao grupo G2..

Fonte Elaboração própria (2022).





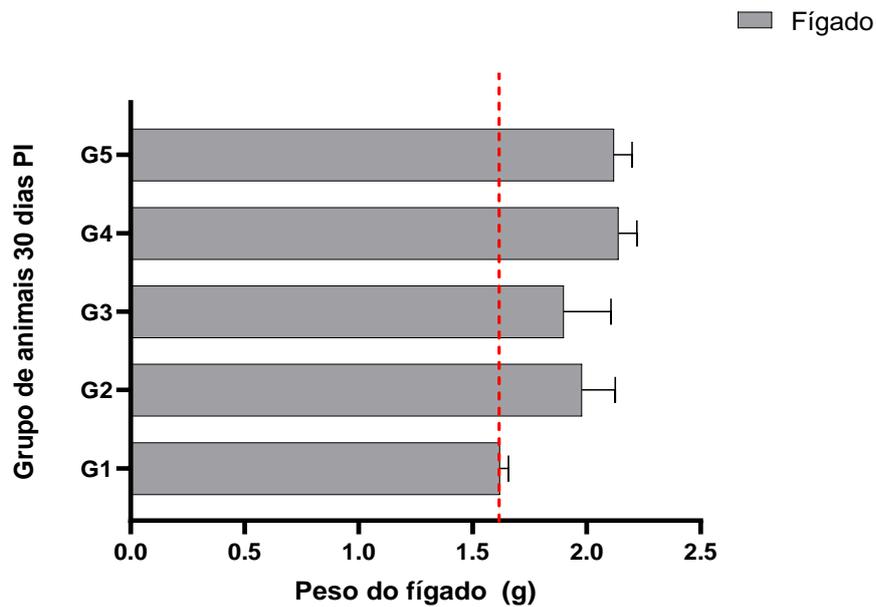
Diferença significativa está representada pelo valor de p (**); $p < 0,01$ redução da média de vermes recuperados do grupo G2 com o G3.
Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 18 - Número de vermes adultos recuperados dos animais infectados e tratados com os compostos (n=5) 45 dias pós infecção. Em (A) número total de vermes recuperados por grupo, em (B) recuperação dos vermes da porção do mesentério e em (C) recuperação dos vermes da porção do fígado.

4.2.2 Peso hepático e esplênico

Aos 30 dias PI, como retratado na figura 19 não foi possível estimar o peso esplênico dos animais eutanasiados. Desta forma não foi realizada análises deste órgão nesse período.

Analisando os valores das medidas do peso hepático, houve elevação no peso em todos os animais dos grupos tratados. Entretanto, esses valores não causaram uma significância estatística.



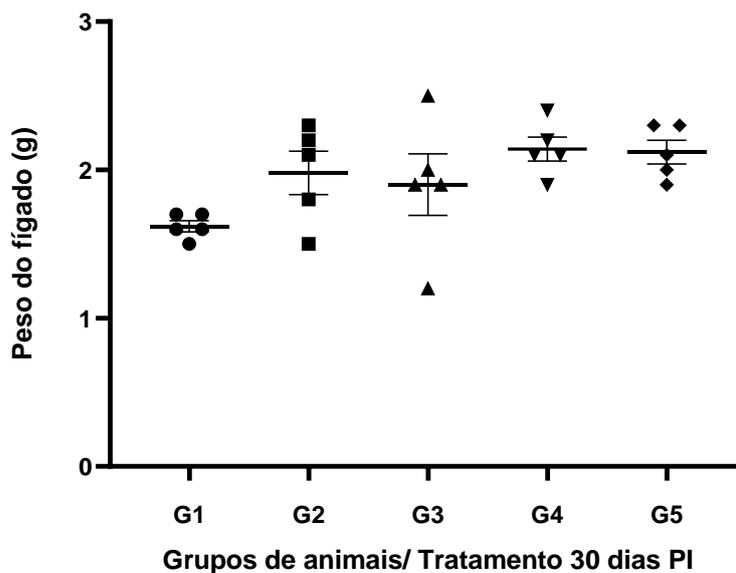
Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 19 - Representação gráfica do peso médio do fígado dos grupos após eutanásia dos animais infectados por *S. mansoni*. Os animais iniciaram seu tratamento 30 dias após a infecção.

Tabela 8 - Peso médio do fígado dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por *S. mansoni*. Os animais iniciaram o tratamento 30 dias após a infecção.

Grupos (n=5)	Órgão (g)
	Fígado
G1	1,6 ± 0,2
G2	2,1 ± 0,3
G3	1,9 ± 0,5
G4	2,3 ± 0,2
G5	2,2 ± 0,3

Fonte: Elaboração própria (2022).



Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 20 - Representação gráfica do peso individual do fígado removido dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por *S. mansoni* referente ao tratamento 30 dias após a infecção.

No ensaio realizado aos 45 dias pós infecção, como demonstrado nas figuras 21 e 22 e na tabela 9, houve alteração nas massas dos órgãos estudados quando são realizadas comparações entre os grupos. O grupo G2 apresentou a menor média de

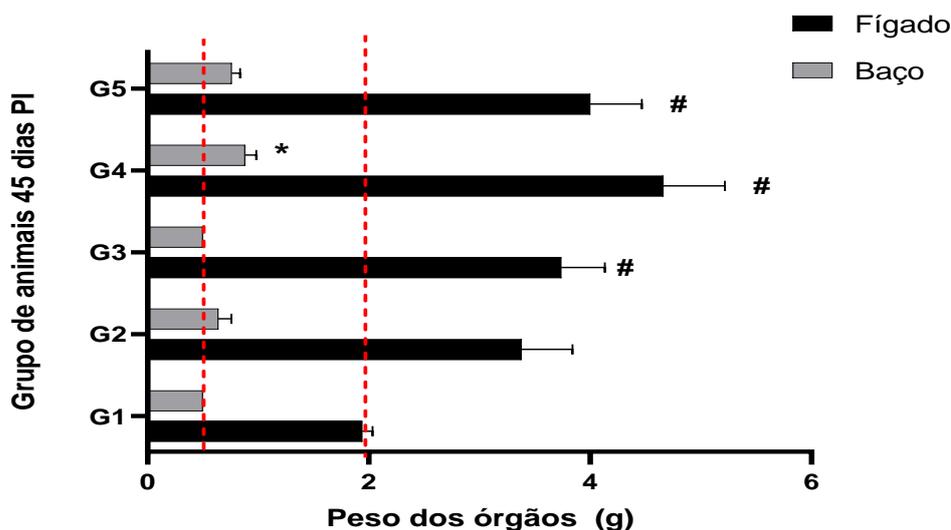
peso de ambos órgãos (fígado $2,0 \pm 0,4$ e baço $0,5 \pm 0$), já o grupo G4 apresentou um maior valor médio \pm DP também de ambos os órgãos (fígado $4,8 \pm 1,0$ e baço $0,9 \pm 0,2$) quando comparado com os demais grupos. Estatisticamente há diferença significativa $p (<0,05)$ e $p (<0,01)$ em relação ao grupo G1.

Tabela 9 - Peso médio dos órgãos removidos dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por *S. mansoni*. Os animais iniciaram seu tratamento 45 dias após a infecção.

Grupos (n=5)	Órgãos (g)	
	Baço	Fígado
G1	$0,5 \pm 0$	$2,0 \pm 0,4$
G2	$0,7 \pm 0,3$	$3,1 \pm 1,2$
G3	$0,5 \pm 0$	$3,7 \pm 1,4$ *
G4	$0,9 \pm 0,2$ *	$4,8 \pm 1,0$ **
G5	$0,7 \pm 0,2$	$4,0 \pm 1,2$ *

As diferenças estatísticas estão representadas (*) $p (<0,05)$ e (**) $p (<0,01)$. Diferenças em relação ao grupo G1.

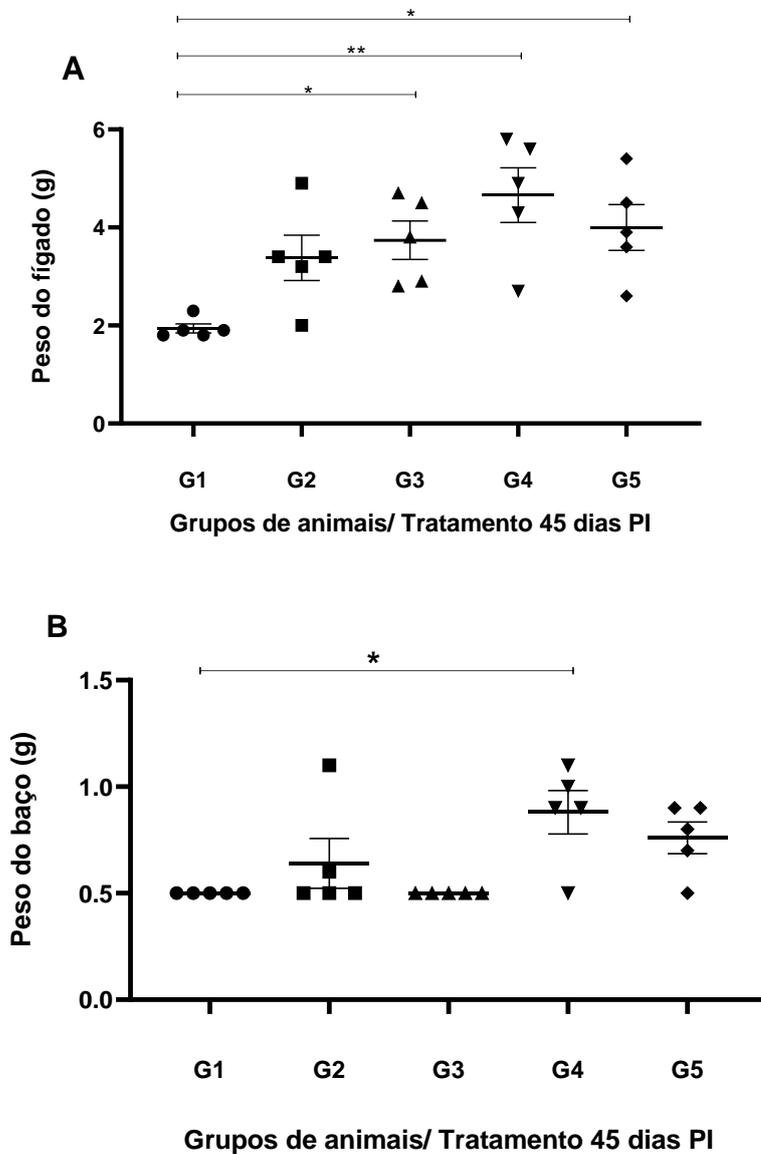
Fonte: Elaboração própria (2022).



Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 21- Peso dos órgãos de camundongos após 45 dias de infecção. No eixo vertical se encontra os grupos de animais tratados e na horizontal os pesos

correspondentes aos órgãos. As diferenças estatísticas estão representadas em relação ao grupo G1.



Em (A) o peso referente ao fígado e em (B) peso do baço. Diferença estatística (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$.

Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 22 - Representação gráfica do peso individual dos órgãos removidos (fígado e baço) dos diferentes grupos de tratamento após eutanásia dos animais infectados por *S. mansoni*. Os animais iniciaram seu tratamento 45 dias após a infecção.

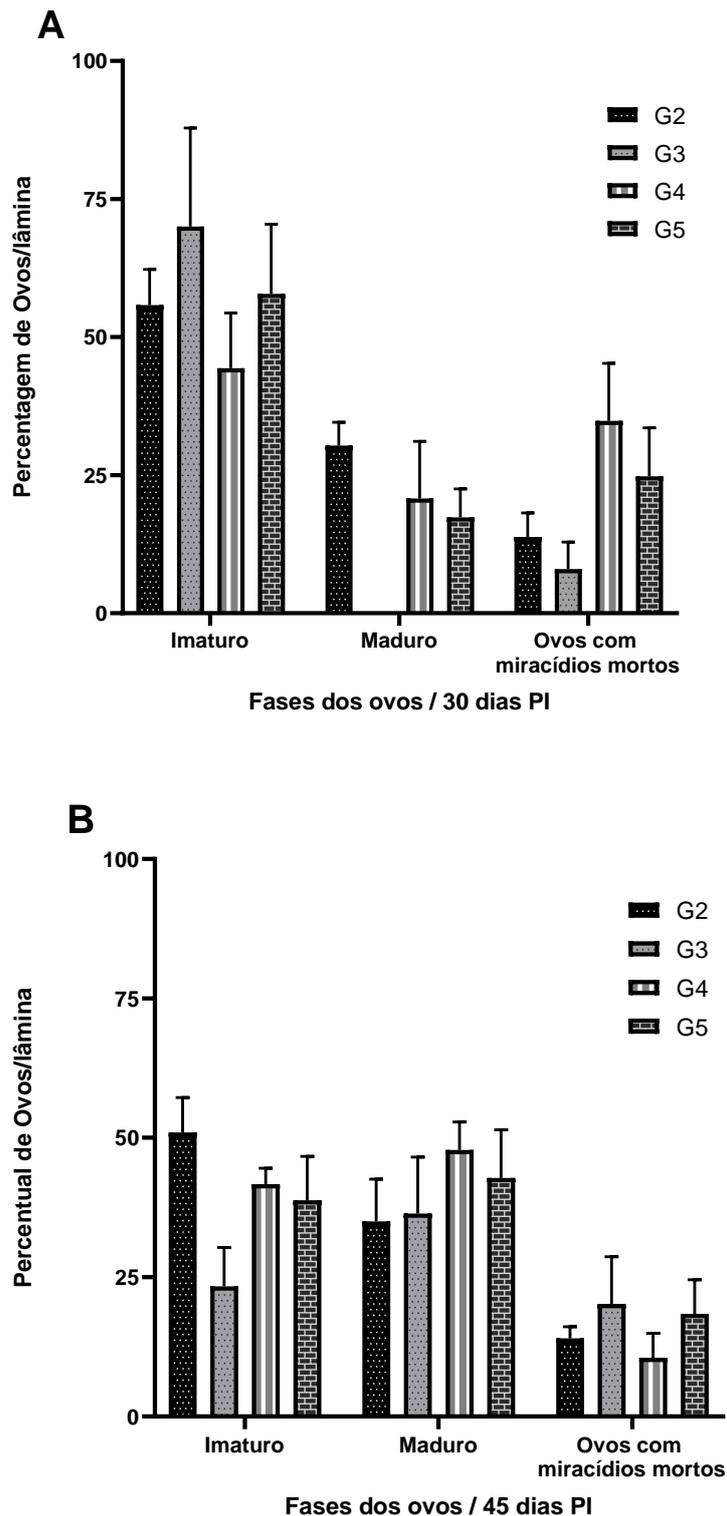
4.2.3 Avaliação quali-quantitativa do oograma

Para avaliar o efeito da ação dos fármacos administrados sobre a quantidade e estágios de desenvolvimento dos ovos foram realizadas análises dos oogramas. A visualização qualitativa mostrou a presença de todos os estágios de desenvolvimento dos ovos, como observado na figura 23 e tabela 10. A análise qualitativa e quantitativa do oograma revelou que os grupos apresentaram grande quantidade de ovos imaturos sugerindo que até o momento da análise estava ocorrendo a oviposição.

Ao correlacionar a média da quantidade de ovos encontrados nos fragmentos intestinais dos animais em estudo nos períodos de infecção 30 e 45 PI, como mostra a tabela 10, observa-se que a quantidade de ovos imaturos encontrada no grupo G3 diminuiu no decorrer da infecção de 30 dias ($4,6 \pm 3,84$) a 45 dias ($3,8 \pm 2,6$), já os ovos maduros e aqueles que continham miracídios mortos aumentaram. No grupo G4, a quantidade de ovos imaturos (30 dias- $12 \pm 7,5$; 45 dias - $20,75 \pm 3$) e maduros (30 dias- $10,4 \pm 11,5$; 45 dias - $23,7 \pm 4,8$) aumentaram e os ovos que continham miracídios mortos diminuíram (30 dias - $11,8 \pm 11,7$; 45 dias- $5,2 \pm 4,4$) no transcorrer da infecção. Já no grupo G5 a quantidade de ovos imaturos (30 dias - $24,8 \pm 12,3$; 45 dias - $19,4 \pm 8,8$) e ovos que continham miracídios mortos (30 dias - $11,8 \pm 10,3$; 45 dias - $9,2 \pm 6,8$) diminuíram e a quantidade de ovos maduros aumentaram (30 dias- $8 \pm 6,1$; 45 dias- $21,4 \pm 9,6$). Não houve diferença estatística sobre o percentual de ovos.

Foi realizada a análise quantitativa através do somatório dos ovos padronizando 50 ovos/lâmina/animal. Esse valor não foi encontrado em todas as lâminas em estudo. Assim, aos 30 dias PI, no grupo G2 1 animal não obteve essa contagem, no grupo G3 todos os animais não obtiveram esse somatório, já nos grupos G4 e G5 dois animais não somaram 50 ovos. Aos 45 dias PI, essa análise revelou que no grupo G3 todos os animais não alcançaram essa soma, no grupo G4 foi analisado 4 animais nos quais apenas 1 não teve esse somatório e por fim o grupo G2 apenas um animal não obteve essa soma.

A análise estatística sobre a quantidade dos ovos revelou significância ($p < 0,05$) nos estágios imaturo e maduro de desenvolvimento dos ovos em ambos os períodos. As diferenças estão relacionadas do grupo G2 com os grupos G3 e G4, como observado na tabela 10.



Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 23 - Percentual de ovos imaturos, maduros e que continham miracídeos mortos nas lâminas contendo fragmento da porção íleo-terminal do intestino dos camundongos. Em (A) quantidade de ovos em 30 dias pós infecção e em (B) quantidade de ovos em 45 dias pós infecção.

Tabela 10 - Média dos números de ovos imaturos, maduros e que continham miracídeos mortos nas lâminas contendo fragmento da porção íleo-terminal do intestino dos camundongos nos diferentes grupos de tratamentos no período de 30 dias PI e 45 dias PI.

Grupos de tratamento (n=5)	ESTAGIO DE DESENVOLVIMENTO DOS OVOS					
	30 DIAS PÓS INFECÇÃO			45 DIAS PÓS INFECÇÃO		
	Imaturo	Maduro	Ovos com miracídeos mortos	Imaturo	Maduro	Ovos com miracídeos mortos
G2	27,4 ± 7,5	14,8 ± 4,3	6,8 ± 4,9	25,4 ± 7	17,40 ± 8,3	7 ± 2,3
G3	4,6 ± 3,84 *	0 *	0,8 ± 0,83	3,8 ± 2,6*	6 ± 4 *	5 ± 4,3
G4	12 ± 7,5 *	10,4 ± 11,5	11,8 ± 11,7	20,75 ± 3 #	23,7 ± 4,8 #	5,2 ± 4,4 #
G5	24,8 ± 12,3	8 ± 6,1	11,8 ± 10,3	19,4 ± 8,8	21,4 ± 9,6	9,2 ± 6,8

(#) G4 (n=4)

(*) diferenças estatísticas em relação ao grupo infectado e não tratado.

Fonte: Elaboração própria (2022).

4.2.4 Análise das áreas granulomatosas

Foram encontrados granulomas em todas as lâminas dos cortes histológicos da porção do fígado estudadas. A análise estatística dos 30 dias PI não apresentou significância. Já no período de 45 dias PI, houve variação estatística ($p < 0,05$) como mostra a figura 24. Foram observadas variações entre o grupo G3 com o grupo G4 e G5.

Na avaliação da média dos granulomas entre os períodos de 30 e 45 dias PI, como mostra a tabela 11, percebe-se um valor menor na média dos granulomas do período de 30 dias PI quando comparados ao período de 45 dias PI.

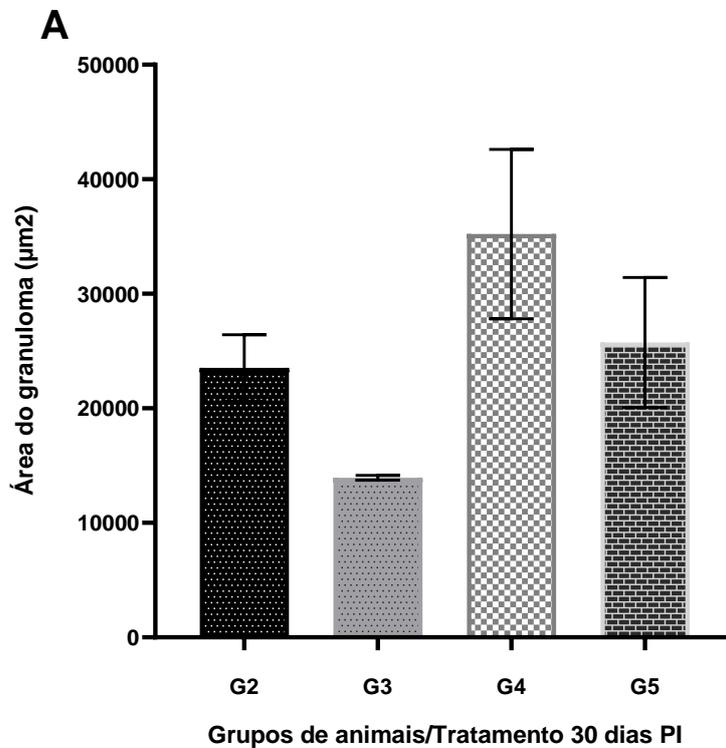
Os tratamentos promoveram diferenças na área/tamanho do granuloma dos animais infectados. No período de 30 dias PI, o grupo G3 apresentou uma redução da área granulomatosa de 59,2% quando comparado ao grupo G2. Já no grupo G4 a

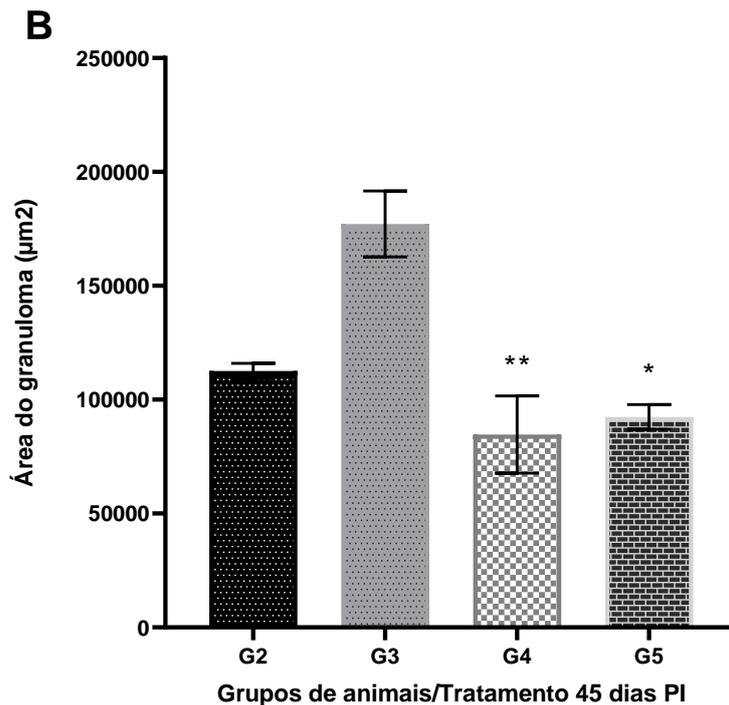
área encontrada apresentou um aumento de 49,72% quando comparado ao grupo G2. O grupo G5 teve um aumento de 9,4% comparado ao grupo G2. No período de 45 dias PI, o grupo G3 apresentou um aumento no valor da área de 57,3% comparado ao grupo G2, já os grupos tratados com tiabendazol não aumentaram o valor da área dos granulomas quando comparado ao grupo G2.

Tabela 11 - Área média dos granulomas encontrados nos cortes de fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* nos períodos respectivos de tratamento.

Grupo	Área dos granulomas μm^2	
	30 dias PI	45 dias PI
G2	23.524,05	112.576,16
G3	13.932,75	177.136,85
G4	35.220,57	84.673,62
G5	25.745,34	92.404,89

Fonte: Elaboração própria (2022). PI Pós infecção





As diferenças estatísticas estão representadas (*) $p < 0,05$ e (**) $p < 0,01$. Diferenças estatísticas em relação ao grupo G3.

Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 24 - Área média dos granulomas encontrados em cortes histológicos do fígado de camundongos infectados com *S. mansoni* nos períodos de 30 dias PI (A) e 45 dias PI (B).

4.2.5 Detecção de anticorpos no soro dos animais por ELISA

Foi realizado apenas a análise para o antígeno SWAP conforme detalhado na figura 25. Os resultados encontrados confirmam os dados do primeiro experimento. Todos os grupos experimentais revelaram a produção do anticorpo frente ao antígeno SWAP em ambos períodos de infecção. Houve uma diferença significativa da concentração sérica de anticorpos reativos contra a preparação de antígenos solúveis de vermes adultos (SWAP) do grupo G3 com os demais grupos de tratamento.

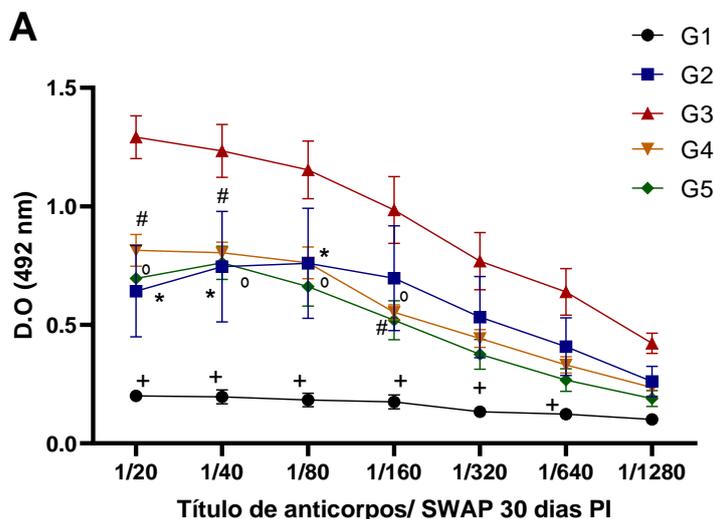
Aos 30 dias PI, os animais tratados com PZQ mostraram reatividade de anticorpos em níveis significativamente superior aos animais do grupo G1 até a diluição de 1/640 ($p < 0,01$). Em relação ao grupo G2 a reatividade foi até a diluição 1/40 ($p < 0,01$).

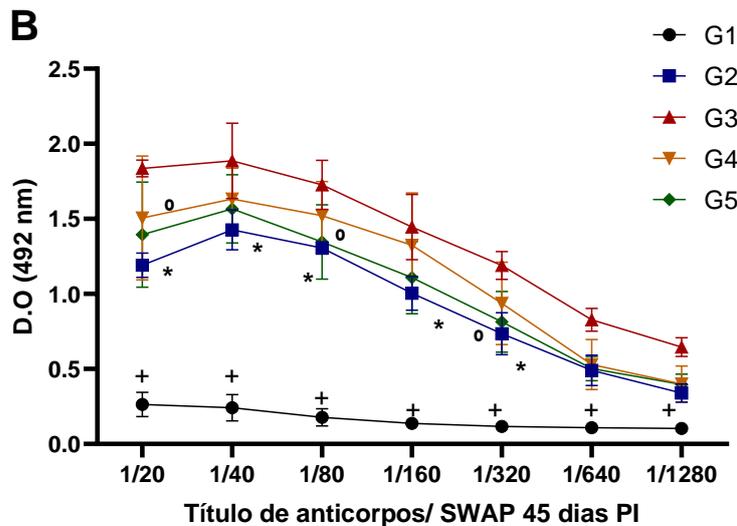
Os níveis de anticorpos reativos com a preparação SWAP dos animais do grupo G3 foram superiores aos níveis de anticorpos detectados no grupo G4 (1/20, 1/40 e 1/160) e no grupo G5 (1/160; $p < 0,05$).

Aos 45 dias PI, os animais do grupo G3 mostraram também essa reatividade de anticorpos em níveis significativamente superior aos animais do grupo G1 em todas as diluições ($p < 0,001$). Em relação ao grupo G2 foi observado reatividade até a diluição 1/320 ($p < 0,0001$).

Os níveis de anticorpos reativos com a preparação SWAP do grupo G3 foram superiores aos níveis de anticorpos detectados pelo grupo G5 nas diluições de 1/20; 1/80 e 1/320 ($p < 0,05$). É visualizado que os títulos de anticorpos aos 45 dias são superiores aos 30 dias PI.

Os valores foram comparados com os encontrados do controle negativo no qual este especificado a seguir: aos 30 dias PI 1/20: $0,199 \pm 0,044$; 1/40: $0,196 \pm 0,058$; 1/80: $0,182 \pm 0,057$; 1/160: $0,174 \pm 0,060$; 1/320: $0,133 \pm 0,020$; 1/640: $0,123 \pm 0,017$ e 1/1280: $0,100 \pm 0,009$. Aos 45 dias PI os valores encontrados foram 1/20: $0,264 \pm 0,0808$; 1/40: $0,241 \pm 0,088$; 1/80: $0,178 \pm 0,057$; 1/160: $0,137 \pm 0,019$; 1/320: $0,117 \pm 0,013$; 1/ 640: $0,109 \pm 0,008$ e 1/1280: $0,103 \pm 0,007$.





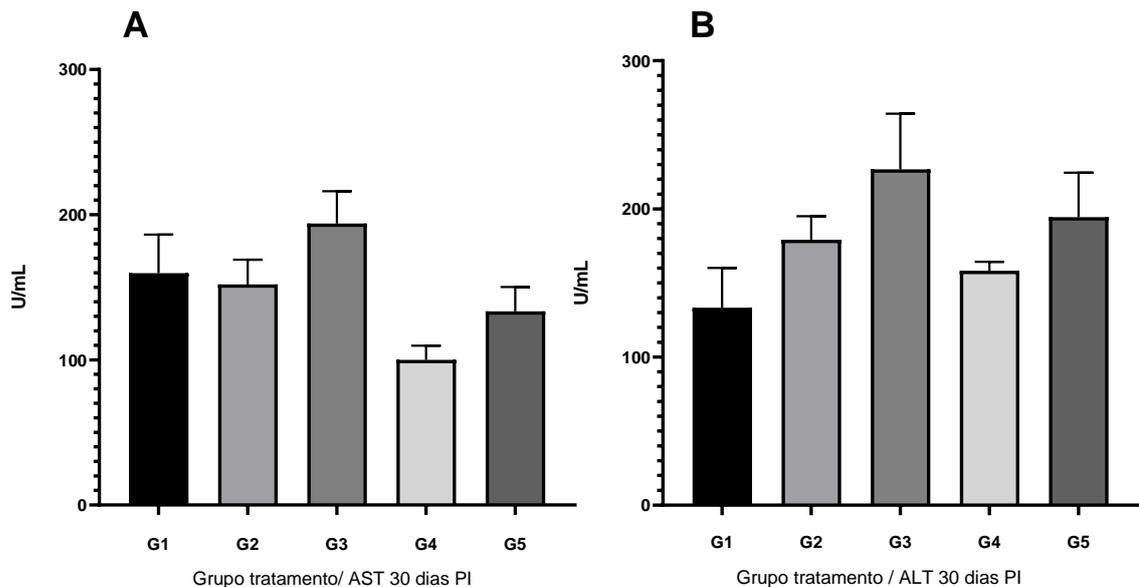
As diferenças estatísticas estão representadas: (+) diferença em relação ao G3 e G1; (*) diferença em relação ao G3 e G2; (#) diferença em relação ao G3 e G4; (°) diferença em relação ao G3 e G5.

Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 25- Avaliação da presença de anticorpos contra o antígeno SWAP em camundongos infectados com *S. mansoni*. Em (A) refere período de 30 dias PI. Em (B) período de 45 dias PI.

4.2.6 Ensaio dos marcadores enzimáticos de hepatotoxicidade.

As concentrações das proteínas ALT e AST foram medidas no soro dos camundongos. De acordo com a figura 26 e com a tabela 12, no período de 30 dias PI, o grupo G3 apresentou níveis elevados de ALT e AST (AST $193,91 \pm 49,62$; ALT $226,73 \pm 83,85$) quando comparado aos demais grupos. Já a menor média encontrada para a enzima ALT foi do grupo G1 ($133,26 \pm 60,18$), e a menor da enzima AST foi do grupo G4 ($99,91 \pm 21,95$). Estatisticamente não houve diferença significativa.



Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 26 - Representação gráfica da média das concentrações das proteínas AST e ALT encontradas nos soros de camundongos Swiss infectados com *S. mansoni* nos períodos de 30 dias PI nos grupos de tratamentos.

Tabela 12 - Valores bioquímicos dos marcadores sérico ALT e AST, obtidos no soro de camundongos infectados ou não por *S. mansoni*, nos períodos de 30 e 45 dias PI.

Grupos (n=5)	ALT		AST	
	30 DIAS PI	45 DIAS PI	30 DIAS PI	45 DIAS PI
G1	133,26 ± 60,18	115,66 ± 22,35	159,75 ± 59,21	107,91 ± 37,17
G2	179,13 ± 35,75	228,86 ± 79,28 *	151,91 ± 38,13	170,91 ± 59,52
G3	226,73 ± 83,85	130,06 ± 12,87	193,91 ± 49,62	114,91 ± 40,86
G4	158,2 ± 13,61	216,2 ± 28,54 *	99,91 ± 21,95	138,75 ± 51,85
G5	194,46 ± 66,90	195 ± 61,09	133,41 ± 37,41	146,41 ± 51,85

PI: Pós infecção. AST: aspartato aminotransferase. ALT: alanina aminotransferase.

(*) Diferença estatística em relação ao grupo G1 com o grupo G2 e G4.

Fonte: Elaboração própria (2022).

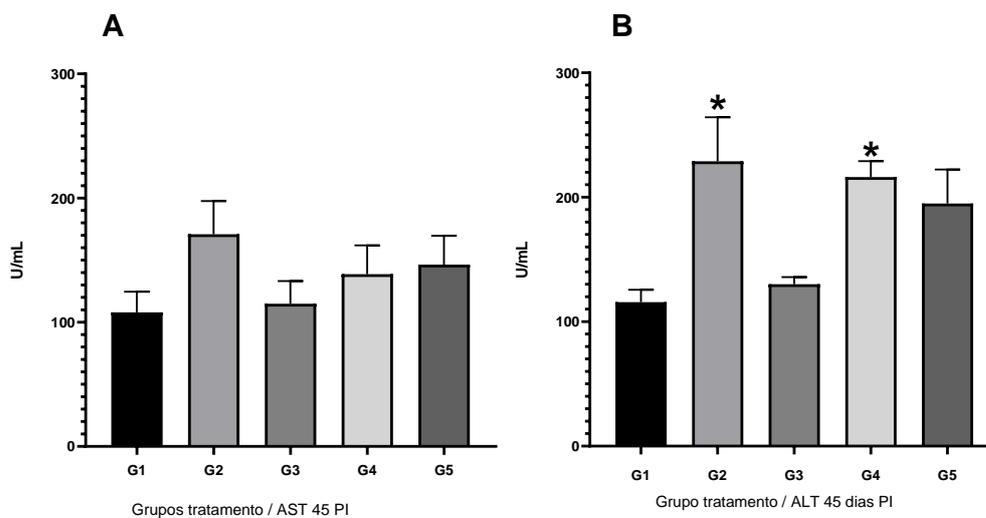
No período de 45 dias PI, como retratado na figura 27 e tabela 12, o grupo G1 apresentou as menores médias de ambos marcadores (AST - 107,91 ± 37,17; ALT- 115,66 ± 22,35). Já as maiores médias foram encontradas pelo grupo G2 para ambos marcadores (AST - 170,91 ± 59,52; 228,86 ± 79,28). Houve estatisticamente diferença

significativa apenas para o marcador ALT em relação ao grupo G1 com o grupo G2 e com o grupo G4.

Analisando individualmente os grupos que receberam algum tratamento, o grupo G3 reduziu os valores de ambos os marcadores no decorrer da infecção (AST – 30 dias: $193,91 \pm 49,62$; 45 dias: $114,91 \pm 40,86$; ALT – 30 dias: $226,73 \pm 83,85$; 45 dias: $130,06 \pm 12,87$) já os grupos G4 (AST – 30 dias: $99,91 \pm 21,95$; 45 dias: $138,75 \pm 51,85$; ALT – 30 dias: $158,2 \pm 13,61$; 45 dias: $216,2 \pm 28,54$) e G5 (AST – 30 dias: $133,41 \pm 37,41$; 45 dias: $146,41 \pm 51,85$; ALT – 30 dias: $194,46 \pm 66,90$; 45 dias: $195 \pm 61,09$) aumentaram.

Todos os grupos que foram infectados apresentaram valores de ALT aumentado em relação ao grupo G1 nos dois períodos de infecção.

Os valores bioquímicos de AST e ALT encontrados pelos grupos G4 e G5 foram inferiores aos valores encontrados pelo grupo G2, exceto no período de 30 dias PI no qual o valor bioquímico do marcador ALT do grupo G5 apresentou um valor superior.



As diferenças estatísticas estão representadas (*) $p < 0,05$. Diferença significativa em relação ao grupo G1 com o grupo G2 e G4.
Fonte: Elaboração própria (2022).

Figura 27 - Representação gráfica da média das concentrações das proteínas AST e ALT encontradas nos soros de camundongos Swiss infectados com *S. mansoni* nos períodos de 45 dias PI nos grupos de tratamentos.

5. DISCUSSÃO

Considerada uma doença negligenciada, a esquistossomose até hoje afeta milhões de pessoas no mundo provocando morbidade crônica (KATZ, 2018). Endêmica no Brasil, esta helmintíase ainda mantém uma positividade importante revelada no Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses (KATZ, 2018), com foco no Estado de Minas Gerais.

Atualmente o único fármaco disponível para o tratamento desta doença infecciosa é o praziquantel, porém o surgimento de cepas resistentes ao tratamento bem como seu sabor amargo e a dificuldade no ajuste de dose para o público pediátrico revelam a necessidade de busca de novas estratégias terapêuticas para o tratamento (FALLON e DOENHOFF 1994; LIANG et al., 2002; CASTRO et al., 2013; OLLIARIO, 2014). Assim, o reposicionamento de fármacos é uma alternativa eficaz pois reduz os custos e a velocidade de desenvolvimento para a validação de um novo fármaco para uma terapia, desta forma o tempo de P&D e os recursos envolvidos são diminuídos (CHONG, 2007; DE QUEIROZ et al., 2018). Neste contexto o presente estudo avaliou o potencial esquistossomicida *in vivo* do fármaco tiabendazol.

Na esquistossomose, a redução da carga parasitária está associada à redução da patologia e a eficácia do tratamento empregado (BOTROS et al., 1989).

Descrito em 1968, e empregado atualmente com adaptações, o método *in vivo* de triagem de fármacos com ação esquistossomicidas, emprega perfusão e é capaz de avaliar o número de vermes e a distribuição desses entre as porções do mesentério e do fígado (PELLEGRINO; KATZ, 1968). Os experimentos *in vivo*, empregando camundongos infectados com *S. mansoni* requerem uma associação de parâmetros para uma avaliação mais completa: (1) a carga parasitária recuperada, (2) distribuição desses vermes entre o mesentério e o fígado e (3) avaliação do oograma (TENDLER et al., 1985; ARAÚJO et al., 1996; VIMIEIRO et al., 2013).

Nas condições experimentais avaliadas, no período de 30 dias PI, as análises do 1º e do 2º experimento não foram reprodutivas. No primeiro experimento o grupo G3 apresentou uma maior taxa de recuperação de vermes e o grupo G5 não obteve recuperação dos vermes eficiente. No segundo experimento o grupo G5 apresentou uma maior taxa de recuperação dos vermes. Não sendo possível uma explicação pautada na literatura para este acontecimento, entretanto a infecção dos camundongos pode ter influenciado de alguma forma essa diferença.

Nessa dissertação foi observado que os grupos G4 e G5 apresentaram baixa recuperação dos vermes. Resultados semelhantes foram encontrados por Pâncera e colaboradores (1997), que em seu experimento infectaram um grupo de camundongos com *S. mansoni* e administraram como tratamento o fármaco tiabendazol 100mg/kg. Esse grupo de animais apresentou uma menor taxa de recuperação de vermes no período de maturação do esquistossomo, ou seja, 25 dias após a infecção. Pâncera et al. (1997) relatam como mecanismo de ação desse fármaco uma imunomodulação inespecífica.

A ausência dos grupos G1, G2 e G3 aos 45 dias PI impossibilitou a análise completa dos dados do 1º ensaio. No segundo ensaio, foi observada uma significativa redução da carga parasitária nos animais tratados com PZQ. Estudos mostram que o fármaco PZQ não apresenta boa eficácia sobre os esquistossomos juvenis, atuando melhor sobre a forma adulta do verme (RIBEIRO et al 2004; WU, WANG E HUANG 2011.) Como relatado por Doenhoff et al., (1987), a falta de eficácia do PZQ nas fases imaturas está associada ao fato da baixa resposta imune do organismo infectado contra o parasito para que ocorra sua eliminação completa.

Em relação a migração dos vermes, no período de 45 dias PI no qual quase todos os vermes já atingiram a maturidade sexual e iniciaram a postura dos ovos, a taxa de vermes recuperados do grupo G2 se concentra em maior quantidade na porção do mesentério conforme descrito em literatura no qual relatam que aos 45 dias pós infecção, com uma presença de um maior número de vermes adultos, 60 a 70 % destes vermes devem se encontrar nas veias mesentéricas e 20 a 30% na veia porta (TENDLER et al., 1985; ARAÚJO et al., 1996; VIMIEIRO et al., 2013). Os grupos G3 e G5, no qual houve a introdução de um fármaco, foi possível observar a migração dos vermes da porção do mesentério para a porção hepática como detalhado por Pellegrino e Katz (1968) no qual mencionam que com o uso de um fármaco ativo, a porcentagem de vermes altera, provocando um deslocamento desses para a porção do fígado (PELLEGRINO; KATZ, 1968; LAGO et al., 2019; SILVA-TORRES et al., 2021). Nos animais do grupo G4 não foi possível observar essa característica de migração.

Este perfil de migração de vermes também foi observado por Silva - Torres e colaboradores (2021), no qual camundongos Swiss infectados com *S. mansoni* foram submetidos a dois regimes terapêuticos e ambos promoveram migração dos vermes da porção do mesentério em direção ao sistema porta hepático. O aumento no

deslocamento parcial dos vermes evidenciado por esses compostos reforça o caráter ativo dos compostos sobre vermes adultos de *S. mansoni*.

Neste estudo, o fármaco tiabendazol administrado nas dosagens de 50 mg/kg e 100 mg/kg não foi efetivo na redução da carga parasitária uma vez que a redução foi inferior aos percentuais preconizados como significativos. De acordo com Botros et al. (2004), um fármaco é considerado de baixa eficiência quando a redução no número de vermes é inferior a 30%. Portanto, o fármaco TBZ nessas dosagens empregadas não apresenta eficácia esquistosomicida. Ressaltando a eficácia do PZQ empregado nestes ensaios que aos 45 dias PI conseguiu reduzir em 83,56% a carga parasitária.

Nesta dissertação em relação ao peso dos órgãos fígado e baço, os resultados encontrados aos 30 dias PI evidenciaram o aumento da massa visceral desses dois órgãos. A análise do baço foi realizada apenas no 1º experimento. Nele a esplenomegalia foi visualizada de forma significativa em todos os grupos de animais infectados. No 2º experimento, por ausência da precisão da balança analítica, não foi possível realizar análise desse órgão. A literatura revela que na patologia da esquistossomose, a presença de ovos nos tecidos induz uma resposta inflamatória e imunológica ocasionando um aumento do peso dos órgãos como o fígado e o baço (CHEN, FOSTER e BENNETT, 1990).

Analisando a massa visceral do fígado, os grupos G4 e G5 apresentaram aumento da massa desse órgão. Em um estudo, Fabri e colaboradores (2014) relataram que o tratamento com o extrato metanólico de *Mitracarpus frigidus* foi capaz de reduzir o aumento do peso do fígado e do baço durante a esquistossomose.

Aos 45 dias PI, foi observado hepatomegalia em todos os grupos de animais infectados. O aumento da massa do baço foi visto em todos os grupos e foi significativa apenas para o grupo G4 em relação ao grupo G1. O grupo G3 não foi capaz de reduzir o tamanho dos órgãos, mas apresentou menor valor de peso do fígado e do baço quando comparado aos demais grupos. O grupo G4 apresentou um valor mais acentuado dos pesos do fígado e do baço que os demais grupos confirmando o que foi observado por Atta et al. (1981) que verificaram que com a evolução da doença os pesos desses órgãos tendem a aumentar. A elevação da massa visceral do fígado é justificada pela mobilização do sistema imunológico contra os ovos do parasito que se alojam no tecido (WARREN, 1975).

Em relação ao baço, o aumento da massa deste órgão está relacionado com uma estimulação antigênica levando a uma hiperplasia das células do sistema fagócito mononuclear (MAGALHÃES; COUTINHO, 1961).

A metodologia do oograma é de fácil execução e por fornecer resultados mais rapidamente é utilizada para a triagem de novos fármacos antiesquistossomóticas, na pesquisa e controle clínico da esquistossomose (MATI e MELO, 2013).

Fragments da porção do íleo de camundongos infectados com *S. mansoni* foram analisados e os ovos encontrados foram classificados como imaturos, maduros, e ovos contendo miracídios mortos. A análise revelou que a maioria dos grupos de tratamento possuíam uma média inferior a 50 ovos, essa quantidade inferior de ovos é devido ao período de análise ser com vermes jovens. Aos 30 dias PI foi constatado que até o momento da eutanásia dos animais estava ocorrendo oviposição, uma vez que foi encontrado em todos os grupos de estudo uma quantidade superior dos ovos no estágio imaturo.

Resultados do oograma aos 30 dias PI, no 1º experimento evidenciaram a ausência de ovos no intestino dos animais do grupo G3. Já no 2º experimento foi encontrado uma média inferior a 50 ovos no intestino dos animais do grupo G3.

Aos 45 dias PI, foi observado em todos os grupos que sofreram algum tratamento, uma maior quantidade de ovos referente ao estágio de desenvolvimento maduro. Pellegrino e colaboradores (1962), mostraram que após administração de um fármaco ativo a porcentagem de ovos viáveis maduros e imaturos sofre mudanças. Essa alteração é justificada pela interrupção da oviposição provocada pela morte dos vermes adultos e logo a maturação de ovos viáveis já ali presentes.

Nesta dissertação, a avaliação qualitativa e quantitativa do oograma mostrou que após administração do tiabendazol em ambas as concentrações não foi observada alterações no desenvolvimento dos estágios dos ovos. Resultados semelhantes também foram encontrados por Hermeto et al., (1994) no qual camundongos foram infectados por *S. mansoni* e tratados com dexametasona (50 mg/kg) aos 42 dias PI, não sendo possível observar diferença na cinética da oviposição havendo uma média maior de ovos maduros e imaturos quando comparados ao grupo de animais não tratados.

Correlacionando com grupo G3, no período de 30 e 45 dias PI, foi possível observar que a média de ovos imaturos diminuiu no decorrer da infecção (30 dias - $4,6 \pm 3,84$ e 45 dias - $3,8 \pm 2,6$). Frezza et al., (2007), detalharam o efeito do

praziquantel sobre o desenvolvimento dos ovos de *S. mansoni*. Em seu experimento, o tratamento realizado com o fármaco lip-PZQ aos 45º dias de infecção apresentou menor quantidade de ovos imaturos em relação aos ovos maduros. Uma vez que não houve alteração no oograma, a administração do fármaco TBZ nas dosagens de 50 mg/kg e 100 mg/kg, no presente estudo não exerce efeito sobre o oograma nas condições testadas. Segundo Katz (2008), um tratamento é eficaz quando ocorre uma parada na postura dos ovos, isso é notado pela ausência de algum dos estágios dos ovos viáveis.

Um aspecto valioso da esquistossomose é a resposta inflamatória granulomatosa causada por antígenos dos ovos que ficam retidos nos tecidos do hospedeiro. Assim, a formação do granuloma é restrita a viabilidade dos ovos maduros não ocorrendo em volta dos ovos imaturos (JURBERG et al., 2009). Segundo Wilson et al., (2007), a gravidade da doença decorre dos granulomas e da fibrose induzida pelos ovos.

Após realização da análise das áreas granulomatosas os resultados encontrados nesse estudo revelaram que os grupos G4 e G5 apresentaram diminuição na área dos granulomas, indicando possibilidade de efeito deste fármaco sobre estes. Resultado semelhante foi relatado por Hewlett et al., (1981), no qual analisaram a ação do TBZ sobre a formação de granulomas pulmonares em camundongos infectados por *S. mansoni*. Foi observado que o fármaco tiabendazol foi o agente supressor mais potente, no qual afetou o tamanho dos granulomas em camundongos não sensibilizados e também naqueles sensibilizados. Pyrrho et al., (2002) avaliaram o efeito do fármaco dexametasona sobre a esquistossomose e o tratamento dos animais infectados mostrou que a administração desse glicocorticoide reduziu significativamente a área dos granulomas.

O grupo tratado com PZQ não apresentou o mesmo efeito sobre os granulomas uma vez que os valores das áreas apresentaram um aumento com o decorrer da infecção, mesmo havendo redução nos números dos vermes adultos e na quantidade de ovos. Embora os camundongos tenham sido expostos ao mesmo número de cercárias, o número de vermes recuperados varia discretamente entre os grupos. Essa divergência na carga parasitária pode ter influenciado de algum modo o desenvolvimento dos granulomas observados, como foi relatado por Silva et al., (2004).

Os títulos de anticorpos contra os antígenos SEA e SWAP foram avaliados. Foi utilizado amostras de soro de 2 animais por grupo. O controle negativo foi respectivo ao grupo G1. A análise dos resultados revelou que todos os tratamentos propostos produziram anticorpos. Os valores mais acentuados de reatividade foram observados no grupo G3. A titulação de anticorpos reativos estiveram mais acentuadas aos 45 dias PI. Os grupos tratados com TBZ em ambas concentrações empregadas não apresentaram significância sobre os títulos de anticorpos. Esse acontecimento pode ser justificado pelo fato da quantidade de animais amostrados ser baixa e nos soros dos animais conter um viés de amostra o que causou essa baixa significância.

Segundo Grenfell et al., (2012), em seu estudo, camundongos foram infectados com *S. mansoni* e avaliados em relação a presença dos anticorpos contra os antígenos SEA e SWAP em três tempos de infecção (30-60 e 140 dias). O ELISA-SWAP detectou melhor amostras positivas com 30 e 60 dias pós-infecção, enquanto o ELISA-SEA detectou amostras após 140 dias.

Para avaliar a toxicidade do fármaco tiabendazol foi realizado a avaliação das enzimas hepáticas ALT e AST. Em relação a análise de hepatotoxicidade, o resultado encontrado nessa dissertação revela que somente o grupo G3 no período de 30 dias apresentou valor de AST superior ao grupo G1. Os outros grupos de animais apresentaram valores inferiores.

No período de 45 dias, os valores de AST de todos os grupos de tratamento foram superiores ao grupo G1. Em seu estudo, Pyrrho et al., (2002), avaliaram o efeito da dexametasona sobre a esquistossomose no qual camundongos foram infectados por *S. mansoni* e tratados com dexametasona. Os resultados mostraram que os níveis de AST foram significativamente maiores em todos os animais com infecção aguda quando comparados ao grupo controle.

Os valores do marcador ALT foram superiores ao grupo G1 nos períodos de 30 e 45 dias PI. Houve significância desse marcador entre o G2 e G1. Como relatado também por Maggi et al., (2021) em seu estudo, durante a esquistossomose aguda houve um aumento significativo do marcador sérico de ALT revelando danos na integridade celular do fígado nos grupos de animais em estudo.

Em nosso estudo, os grupos G2 e G4 não reduziram a carga parasitária e apresentaram valores altos de ALT. França e colaboradores (1993), relataram em seu estudo que a alta carga parasitária é um dos mecanismos da elevação de ALT.

A avaliação da toxicidade nos camundongos infectados experimentalmente com *S.mansoni* revelou que a administração de TBZ não chegou a provocar danos hepáticos consideráveis uma vez que os valores encontrados foram menores ao grupo G2. Evidenciando que a elevação desses marcadores é proveniente da infecção pelo *S. mansoni*. Segundo Tao et al. (2003), a inflamação decorrente da infecção da esquistossomose afeta os níveis das enzimas hepáticas.

De acordo com Couto et al. (2008), modificações hepáticas são significantes na patologia da esquistossomose mansoni, sendo que a concentração sérica de ALT é o melhor indicador para a integridade celular do fígado quando comparado a AST, sendo esta mais específica para avaliar os danos hepáticos (GIANNINI, TESTA, SAVARINO, 2005). Segundo Barbosa et al., (2005), a atividade sérica da AST é mais útil para avaliar a gravidade da doença uma vez que esta enzima é predominante mitocondrial estando presente em maior proporção no fígado, sendo liberada quando o dano for maior. De acordo com Ettinger e Feldman (1997), após uma lesão hepática há o aumento dos valores das aminotransferases.

O somatório dos dados mostra que o fármaco tiabendazol nas concentrações de 50 mg/kg e 100mg/kg não promove danos hepáticos e foi capaz de reduzir a área dos granulomas de fase aguda, estimulando novos ensaios com este fármaco.

6. CONCLUSÃO

Os resultados *in vivo* sugeriram que o fármaco tiabendazol nas dosagens de 50 mg/kg e 100 mg/kg não foi capaz de provocar danos hepáticos nos animais tratados e foi efetivo na redução das áreas granulomatosas.

As dosagens de tiabendazol utilizadas não foram efetivas na redução da carga parasitária e não afetaram os estágios de desenvolvimento dos ovos observados pela análise do oograma. Assim, o reposicionamento do fármaco tiabendazol no esquema terapêutico empregado de duas doses nas concentrações de 50 mg/kg e 100 mg/kg não se classifica como uma boa opção terapêutica no combate da esquistossomose mansônica.

Diante dos dados obtidos é necessário realizar novos ensaios com este fármaco.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDULLA, M. H.; et al. Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. **PLoS medicine**, v. 4, n. 1, p. e14, 2007. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosmedicine/article?id=10.1371/journal.pmed.0040014>>. Acesso em: 15 jun. 2022.
- ANDRICOPULO, A. D.; GUIDO, R. V. C; OLIVA, G. Virtual screening and its integration with modern drug design technologies. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 1, p. 37-46, 2008. Disponível em: <<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2008/00000015/00000001/art00003>>. Acesso em: 20 ago. 2022.
- ARAÚJO, N. et al. Suscetibilidade aos agentes quimioterápicos de isolados de *Schistosoma mansoni* oriundos de pacientes tratados com oxamniquine e praziquantel e não curados. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 29, p. 467-476, 1996. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/5k9snYvCkXmk9wFtTT8pkvc/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 14 nov. 2022.
- ATTA, A. M.; et al. Schistosomiasis mansoni. I-evolution of the pathologic picture: parasitologic, hematologic, and histopathologic analyses. **Revista de Saúde Pública**, v. 15, p. 72-92, 1981. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsp/a/VBMm6SCnDr7X96nzm37zrP/abstract/?lang=en&format=html>>. Acesso em: 15 ago. 2022.
- BARBOSA, K. V. et al. Abordagem de anormalidades laboratoriais das enzimas hepáticas em pacientes assintomáticos. **HU rev**, p. 44-48, 2005. Disponível em: <<https://docs.bvsalud.org/biblioref/2016/10/2356/73-11-pb.pdf>> Acesso 12 nov. 2022.
- BENET, L. Z.; BROCCATELLI, F; OPREA, T. I. BDDCS applied to over 900 drugs. **A revista AAPS**, v. 13, n. 4, p. 519-547, 2011. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1208/s12248-011-9290-9>>. Acesso em: 19 ago. 2022.
- BOTROS, S.; SOLIMAN, A.; EL-GAWHARY, N.; SELIM, M.; GUIRGUIS, N. Effect of combined low dose praziquantel and oxamniquine on different stages of schistosome maturity. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.83, n.1, p.86-89, 1989. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0035920389907207>> . Acesso 19 nov 2022.
- BOTROS, S et al. Lack of evidence for an antischistosomal activity of myrrh in experimental animals. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 71, n. 2, p. 206-210, 2004. Disponível em: <<https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/71/2/article-p206.xml>> Acesso 20 ago 2022.

BRASIL. Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) – Coordenadoria do Controle de Doenças. Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose: **Normas e Instruções Controle da Esquistossomose do Estado de São Paulo/PCE-SP**, versão 2007. Disponível em: <<https://www.novaconcursos.com.br/arquivos-digitais/erratas/14621/18730/esquistossomose-normas.pdf>>. Acesso em: 06 set. 2022.

CASTRO, A. P.; et al. Medicinal plants and their bioactive constituents: a review of bioactivity against *Schistosoma mansoni*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 21, p. 1515-1522, 2013. Disponível em: <<https://academicjournals.org/journal/JMPR/article-full-text-pdf/808CB2027777>>. Acesso em: 26 ago. 2022.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Drug resistance in schistosomes. **Parasitol. Today**, v. 9, n. 5, p. 162-166, 1993. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0169475893901386>>. Acesso em: 18 abril 2022.

CRELLEN, T.; et al. Reduced Efficacy of Praziquantel Against *Schistosoma mansoni* Is Associated With Multiple Rounds of Mass Drug Administration. **Clinical infectious diseases**, v. 63, n. 9, p. 1151-1159, 2016. Disponível em: <<https://academic.oup.com/cid/article/63/9/1151/2576546>>. Acesso em: 06 set. 2022

CHONG C.R; SULLIVAN, D.J. Jr; New uses for old drugs. **Nature**; v.448, p. 645-646, 2007. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/448645a>>. Acesso em: 22 abril. 2022

CHEN, Guo-Zhong; FOSTER, L; BENNETT, J. L. Antischistosomal action of mevinolin: evidence that the activity of 3-hydroxy-methylglutaryl-coenzyme a reductase in *Schistosoma mansoni* is vital for the survival of the parasite. **Naunyn-Schmiedeberg Pharmacology Archives**, v. 342, n. 4, p. 477-482, 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2123968/>>. Acesso em: 21 ago. 2022.

COUTO, J. L. A. et al. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, p. 390-393, 2008. Disponível em: , <<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/gh7J3Q6FhyHFnr3c5dkm7N/?lang=pt>> Acesso em: 14 nov. 2022.

DANSO-APPIAH, A.; et al. Drugs for treatment *Schistosoma mansoni*. **Cochrane, Database of Systematic Reviews**, n. 2, 2013. Disponível em: <<https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD000528.pub2/full>>. Acesso em: 16 set. 2022.

DE ALMEIDA SILVA, R. D. M; NETO, A. M. A; DA SILVA, E. P. O uso do praziquantel no tratamento da Esquistossomose no Município de Limoeiro-PE. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, v. 2, n. 1, p. 98-98, 2021. Disponível em: <<https://editoraime.com.br/revistas/index.php/remsa/article/view/921>>. Acesso em: 06 set. 2022

DE QUEIROZ, T. G. A; DE MORAES, J. Atividade anti-helmíntica do anti-inflamatório betametasona em *Schistosoma mansoni*. **Revista Educação-UNG-Ser**, v. 12, n. 2 ESP, p. 40, 2018. Disponível em <<http://revistas.ung.br/index.php/educacao/article/view/3216>>. Acesso em: 14 nov. 2022

DOENHOFF, M. J; Sabah, A.A; Fletcher, C, Webbe G, Bain J. Evidence for a imunedependenceaction of Praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** V. 81, n. 6, p. 947-51, 1987. Disponível em: <<https://academic.oup.com/trstmh/article-abstract/81/6/947/1895394?login=false>>. Acesso em: 18 set. 2022.

DUBEY, A.K; SANYAL, P.K. Benzimidazoles in a worm world. *Veterinary Scan. Online Veterinary Medical Journal*, v. 5, n. 2, 2010. Disponível em: <<https://journal.vetscan.co.in/index.php/vs/article/view/72>>. Acesso em: 6 set. 2022.

DRUGBANK: a major update to the. 2018. Disponível em: <<https://go.drugbank.com/drugs/DB00730>>. Acesso em: 26 mar. 2022. Banco de dados.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária.** Intermédica. 1998.

FABRI, R. L et al. Chromatographic fingerprint analysis and effects of the medicinal plant species *Mitracarpus frigidus* on adult *Schistosoma mansoni* worms. **BioMed Research International**, v. 2014. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/941318/>> Acesso em: 19 nov. 2022

FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** v. 51, p. 83–88, 1994. Disponível em: <<https://www.ajtmh.org/view/journals/tpmd/51/1/article-p83.xml>>. Acesso em: 23 set. 2022.

FRANÇA, A. V. C. et al. Prováveis mecanismos de elevação da alanina aminotransferase na esquistossomose mansônica (em). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 35, n. supl. 10, p. s38, 1993. Disponível em: <<https://repositorio.usp.br/item/000864189>> Acesso em 20 nov.2022

FREZZA, T. F. et al. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, p. 209-214, 2007. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/70140>>. Acesso em: 26 ago. 2022.

GIANNINI, E.G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v.172, n.3, p.367-379, 2005. Disponível em: <<https://www.cmaj.ca/content/172/3/367.short>>. Acesso em: 02 set. 2022.

GRENFELL, R. F. Q. et al. Antigens of worms and eggs showed a differentiated detection of specific IgG according to the time of *Schistosoma mansoni* infection in mice. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p. 505-509, 2012. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/X65JdXC7QH7vVhhdBzLkdjb/?format=html>> Acesso 03 out. 2022.

HERMETO, M. V; et al. Oogram studies in mice infected with *Schistosoma mansoni* and treated with dexamethasone. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 36, p. 99-103, 1994. Disponível em : <<https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/gR6fvg7KndSCd44kCTHpMdr/?lang=en>> Acesso 15 out 2022.

HEWLETT, E. L. et al. In vivo suppression of delayed hypersensitivity by thiabendazole and diethylcarbamazine. **Immunopharmacology**, v. 3, n. 4, p. 325-332, 1981. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0162310981900254>>. Acesso em: 22 set. 2022.

HINZ, R. et al. Serological approaches for the diagnosis of schistosomiasis—A review. **Molecular and Cellular Probes**, v. 31, p. 2-21, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890850816301190>>. Acesso em: 22 set. 2022.

JURBERG, A. D.; et al. The embryonic development of *Schistosoma mansoni* eggs: proposal for a new staging system. **Development Genes and Evolution** 219, 219–234. 2009. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00427-009-0285-9>>. Acesso em: 25 ago. 2022.

KATZ, N. **Schistosoma mansoni esquistossomose**: uma visão multidisciplinar. 1st ed. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2008. E-book.

KATZ, N; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Cien. Culto**. São Paulo, v. 55, n. 1, p. 38-43, 2003. Disponível em <http://cienciaecultura.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0009-67252003000100024>. Acesso em: 25 ago. 2022.

KATZ, N. et al. Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geo-helminthoses. Fiocruz: Belo- Horizonte. 2018. Disponível em: <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/25662>>. Acesso em: 26 ago. 2022.

KÖHLER, P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. **International Journal for Parasitology**, v. 31, n. 4, p. 336-345, 2001. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002075190100131X>>. Acesso em: 02 set. 2022

LAGO, E, M. et al. Phenotypic screening of nonsteroidal anti-inflammatory drugs identified mefenamic acid as a drug for the treatment of schistosomiasis. **EBioMedicine**, v. 43, p. 370-379, 2019. Disponível em : <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352396419302683#bb0210>>. Acesso em 14 nov. 2022.

LIANG, Y.–S. et al. Adult worm tegumental damage and egg-granulomas in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* treated in vivo. **Journal of Helminthology**, v. 76, n. 4, p. 327–333, dez. 2002. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/journal-of-helminthology/article/abs/adult-worm-tegumental-damage-and-egggranulomas-in-praziquantel-resistant-and-susceptible-schistosoma-mansoni-treated-in-vivo/10EA785CD2D933E7B0009E4644C4CFA8>>. Acesso em: 03 set. 2022

LOVERDE, P. T. Schistosomiasis. **Adv Exp Med Biol**, v. 1154, p.45-70, 2019. Disponível em:< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31297759/>>. Acesso em: 20 maio. 2022.

MACEDÔNIA, J. G.; et al. Kinetics of Egg Production and Egg Excretion by *Schistosoma mansoni* and *S. japonicum* in Mice Infected with a Single Pair of Worms. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 3, p. 281, 1994. Disponível em: <<https://works.swarthmore.edu/fac-engineering/35/>>. Acesso em: 22 ago. 2022.

MAGALHÃES, F. A.; COUTINHO, E. M. Lesões esplênicas iniciais na Esquistossomose mansônica humana. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, São Paulo, v.2, p. 251 - 259, 1961. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsp/a/VBMm6SCnDr7X96nzmf37zrP/?format=pdf&lang=pt>>. Acesso em: 8 set. 2022

MAGGI, L et al. The IL-33/ST2 pathway is not essential to Th2 stimulation but is key for modulation and survival during chronic infection with *Schistosoma mansoni* in mice. **Cytokine**, v. 138, p. 155390, 2021. Disponível em: < <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2020.155390>>. Acesso 16 nov. 2022.

MATI, V. L. T.; MELO, A. L. Current applications of oogram methodology in experimental schistosomiasis; fecundity of female *Schistosoma mansoni* and egg release in the intestine of AKR/J mice following immunomodulatory treatment with pentoxifylline. **Journal of Helminthology**, v. 87, n. 1, p. 115-124, 2013. Disponível em :< <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22390937/>> . Acesso em: 14 nov. 2022.

MCMANUS, D.P.; et al. Schistosomiasis. **Nat Rev Dis Primers**, vol 4, n.13, 2018. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41572-018-0013-8>>. Acesso em: 6 set. 2022.

MDULUZA, T; MATUPI, F. Putting pediatric schistosomiasis treatment in context. **Infect Dis Poverty**. V. 6, n. 1, p. 85, 2017. Disponível em: < <https://idpjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40249-017-0300-8>>. Acesso em: 05 set. 2022.

MODHA, J.; LAMBERTUCCI, J.R.; DOENHOFF, M.J.; McLAREN, D.J. Immune dependence of schistosomicidal chemotherapy: an ultrastructural study of *Schistosoma mansoni* adult worms exposed to praziquantel and immune serum in

vivo. **Parasite Immunol.** V. 12, n. 3, p. 321-334. May 1990. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2117266/>>. Acesso em: 29 ago. 2022.

MORGAN, J. A. T.; et al. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. **Parasitology**, v. 123, n. 7, p. 211-228, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11769285/>>. Acesso em: 02 set. 2022.

ONGURU, D.; et al. Human schistosomiasis is associated with endotoxemia and Toll-like receptor 2-and 4-bearing B cells. **The American Journal of Tropical Medicine and Higiene**, v. 84, n. 2, p. 321, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3029191/>>. Acesso em: 12 set. 2022.

OMS.; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas. 2010 Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/primeiro_relatorio_oms_doencas_tropicai.pdf>. Acesso em: 05 ago. 2021.

OMS.; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Anúncio sobre plano de saneamento e higiene para a erradicação de doenças tropicais até 2020. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/oms-anuncia-plano-de-saneamento-e-higiene-para-a-erradicacao-de-doencas-tropicais-ate-2020/>>. Acesso em: 08 set. 2021

OMS.; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Esquistossomose [Internet]. Genebra: OMS; 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>> Acesso em: 20 set. 2022.

OLIVEIRA, F. A.; **Avaliação do efeito do praziquantel, da oxamniquina e da associação destas drogas sobre o verme adulto de *Schistosoma mansoni*.** 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde - Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, 2005. Disponível em <<https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/20772>>. Acesso em: 16 set. 2022.

OLLIARO, P; DELGADO-ROMERO, P; KEISER, J. The little we know about the pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel (racemate and R-enantiomer). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 863-870, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24390933/>>. Acesso em: 02 set. 2022.

PANCERA, C. F. et al. Effect of wide spectrum anti-helminthic drugs upon *Schistosoma mansoni* experimentally infected mice. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 39, p. 159-164, 1997. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rimts/a/SPm8L34cjbqtffsTCgbmXcx/abstract/?lang=en>> Acesso em: 12 set. 2022.

PELLEGRINO, J.; SIQUEIRA, A. F. A perfusion technic for recovery of *Schistosoma mansoni* from experimentally infected guinea pigs. **Revista brasileira de malariologia e doenças tropicais. Publicações avulsas**, v. 8, n. 4, p. 589-597, 1956.

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. **Advances in parasitology**, v. 6, p. 233-290, 1968. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0065308X08603917>>. Acesso em: 28 ago. 2022.

PELLEGRINO, J.; et al. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 11, n. 2, p. 201-215, 1962. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14484966/>>. Acesso em: 28 ago. 2022

PYRRHO, A. S. et al. Dexamethasone, a drug for attenuation of *Schistosoma mansoni* infection morbidity. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 11, p. 3490-3498, 2002. Disponível em: <<https://journals.asm.org/doi/10.1128/AAC.46.11.3490-3498.2002>>. Acesso em: 02 set. 2022.

RENAME.; RELAÇÃO NACIONAL DE MEDICAMENTOS ESSENCIAIS: Rename 2020. Brasília: Ministério da Saúde, p. 217, 2020. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/cartilhas/2019/rename-2020-final-pdf/view>>. Acesso em: 20 ago. 2022.

RIBEIRO, F. et al. Synergistic action of praziquantel and host specific immune response against *Schistosoma mansoni* at different phases of infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 46, p. 231-233, 2004. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/9M8F74PXQnXxzPGJtC4DH6L/?lang=en>>. Acesso em: 10 set. 2022.

ROLLEMBERG, C. V. V.; et al. Aspectos epidemiológicos e distribuição geográfica da esquistossomose e geo-helminthos, no Estado de Sergipe, de acordo com os dados do Programa de Controle da Esquistossomose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 91-96, 2011. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/rsbmt/a/hB5TC57sJKxQbbTZsgbqJpw/abstract/?lang=pt>>. Acesso em: 12 set. 2022.

SÉIDE, M. et al. O fungicida tiabendazol causa apoptose em hepatócitos de ratos. **Toxicologia in Vitro**, v. 32, p. 232-239, 2016. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233315300412?casa_token=sTXVN9B6iC0AAAAA:CRxwLbpaLr4MuMwsYbHlwfRxNuTgFQZUiK-bQ-gtKmjeVNVkvc7OtL7uxRLIhmOc5XULOnLPoQ> Acesso 15 nov. 2022.

SILVA, L. M. et al. Comparison of immune responses of *Schistosoma mansoni*-infected mice with distinct chronic forms of the disease. **Acta tropica**, v. 91, n. 2, p. 189-196, 2004. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001706X04001056?casa_token=lqOlszKrQysAAAAA:PK250e3SZvXI37pe5y2PjA6rN0mncj2sCdVcT9GunOf_UI3kxWfMkD0RhAxb3-WFoJ_aphEmBQ>. Acesso em: 03 nov. 2022.

SILVA-MORAES, V.; et al. Diagnosis of *Schistosoma mansoni* infections: what are the choices in Brazilian low-endemic areas? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 114,

2019. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/mioc/a/Mz5Vv84MVZytnFwHSRS9c6z/?lang=en>>. Acesso em: 26 ago. 2022

SILVA-TORRES, D.; et al. Synthetic auronones: New features for *Schistosoma mansoni* therapy. **Chemistry & Biodiversity**, v. 18, n. 11, p. e2100439, 2021.

Disponível em <

https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cbdv.202100439?casa_token=3TsfYNgFPHgAAAAA%3AvRsc992WMgqm9nCb4TZ5DIJpVUb8PD1xnLkAzY5uEZUkXupa5N18b5NEV7qu8oYCVw7JEdZQbOGLeg . Acesso 14 nov. 2022

SIQUEIRA, L. P *et al.* Schistosomiasis: Drug used and treatment strategies. **Acta Tropica**, v.176, n.1, p.179- 187, 2017. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28803725/>>. Acesso em: 03 set. 2022.

SIQUEIRA-BATISTA, R et al. **Esquistossomoses humanas**. In: Siqueira-Batista R, et al. (editores). Medicina tropical. Uma abordagem atual das doenças infecciosas e parasitárias. 1ª ed. Vol. 1. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2000. p. 251-72.

SOUZA, F. P. C.; et al. Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural. **Rev Bras Clin Med**, v. 9, n. 4, p. 300-307, 2011.

Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-594912>>. Acesso em: 22 ago. 2022

TAO, J et al. Influence factors of serum fibrosis markers in liver fibrosis. **World Journal of Gastroenterology**, v. 9, n. 11, p. 2497, 2003. Disponível em<

www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4656527/>. Acesso em 20 nov.2022.

TENDLER, M. et al. *Schistosoma mansoni*: Comparative evaluation of different routes of experimental infection. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, p. 111-114, 1985. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/rimtsp/a/tSLFDQkVH5Wtp96fjB9VFQf/abstract/?lang=en> >. Acesso em 14 nov 2022

TRACY, J.W., WEBSTER, L.T. Jr; Drugs Used in the Chemotherapy of Helminthiasis. Hardman, J.G., Limbird, L.E., Gilman, A.G. (Ed.), Goodman and Gilman's. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 10ed. The McGraw-Hill Companies. U.S.A. 2001.

VALE, N. et al. Praziquantel for schistosomiasis: single-drug metabolism revisited, mode of action, and resistance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 5, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28264841/>>. Acesso em: 18 ago. 2022

VIMIEIRO, A. C. S. et al. Schistogram changes after administration of antischistosomal drugs in mice at the early phase of *Schistosoma mansoni* infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 881-886, 2013. Disponível em:

<<https://www.scielo.br/j/mioc/a/JCmKcV5zRDZLLPQfbf55P7x/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 14 nov. 2022.

VITORINO, R. R.; et al. Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle. **Rev Soc Bras Clin Med**, v. 10, n. 1, p. 39-45, 2012. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-612009>>. Acesso em: 30 ago. 2022

WARREN, K. S. Hepatosplenic schistosomiasis: an immunological disease. **Bull NY Acad Sci**. v. 51, n. 4, p. 591-633, 1975. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1091317/>>. Acesso em: 04 set. 2022.

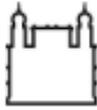
WILSON, M. S. et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 148-154, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1038/sj.icb.7100014>> Acesso em: 02 nov. 2022.

WHO. World health organization. Suíça. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 25 mar. 2022.

WU, W; WANG, W; HUANG, Y. New insight into praziquantel against various developmental stages of schistosomes. **Parasitology research**, v. 109, n. 6, p. 1501-1507, 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21984370/>>. Acesso em: 29 ago. 2022.

ANEXO

ANEXO A – LICENÇA CEUA/FIOCRUZ



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Vice- Presidência de Pesquisa e
 Coleções Biológicas



**Comissão de Ética
 no Uso de Animais**

LICENÇA**LW-32/21**

Certificamos que o protocolo (P-26/21-3), intitulado "Avaliação do potencial terapêutico do Tiabendazol sobre a esquistossomose murina", sob a responsabilidade de PAULO MARCOS ZECH COELHO, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exige a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 13/12/2025 e inclui o uso total de :

Mus musculus

- 165 Fêmeas de Swiss webster, Idade: 1 Mes(es), Peso: 28,0000 Grama(s).

Rio de Janeiro, 13 de dezembro de 2021

Etelcia Molinaro
Coordenadora da CEUA/FIOCRUZ