

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

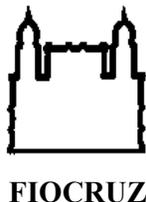
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE FÁRMACOS PRÓ-OXIDANTES
SOBRE O *Schistosoma mansoni***

CIRO RIBEIRO FILADELFO

**Salvador - Bahia – Brasil
2009**



**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE E MEDICINA INVESTIGATIVA**

***Avaliação in vitro de fármacos pró-oxidantes
sobre o Schistosoma mansoni***

Ciro Ribeiro Filadelfo

Orientador: Dr. Marcos André Vannier dos Santos

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Oswaldo Cruz para obtenção do título de mestre em ciências.

**Salvador - Bahia – Brasil
2009**

Dedico a minha mãe, *in memoriam*, pelo amor incondicional e ao meu pai, *in memoriam*, por ter me ensinado a viver. Sei que o concreto não existe mais, porém a lembrança e o amor jamais perderei.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me concedido o dom da vida.

À minha mãe, que foi a mais concreta forma de amor que já recebi.

Ao meu pai, por ter me ensinado a conviver com as dificuldades, ou seja, por tudo.

À minha amada esposa Tâmara, por ter me dado o chão nos momentos difíceis e pelo seu amor verdadeiro.

Aos meus irmãos Bruno e Ulliana pelo incentivo e constante apoio, que foram fundamentais para o meu crescimento. Sei que posso contar com vocês para o que der e vier.

Ao meu orientador Dr. Marcos André Vannier dos Santos, pela sua orientação, estímulo e apoio durante todo o desenvolvimento dessa pesquisa.

A equipe do Laboratório de Biomorfologia Parasitária, Ana Lúcia, Ebenézer, Rafael Costa, Daniel Abreu, Danielle, Diogo, Tayane, Thiara, Gustavo, Fernanda, Eliete, Karla, Rafael Gomes, Vanessa, Diego e Eliomara, pela força, por ter me ajudado a compreender cada vez mais o meu trabalho. Uma equipe que me fez aprender muito.

À Dra. Adriana Lanfredi Rangel, Cláudio Figueira e José Maurício, pela amizade e disposição em me auxiliar nos procedimentos relacionados à microscopia eletrônica.

Ao grupo do Laboratório de Patologia e Biointervenção, especialmente Thayna e Pillar, que foram pessoas fundamentais neste trabalho, minha eterna gratidão.

À Juliana do Laboratório de Bioquímica Redox (UFRJ), pela paciência, disposição e amizade.

Aos meus grandes e melhores amigos, Ebenézer e Rafael Costa, que foram mais que amigos, foram irmãos de verdade e me ajudaram a levantar, quando achava que não tinha mais como continuar.

Aos colegas de Pós-graduação, que tive imenso prazer de conhecer.

Aos professores do curso de Pós-graduação, que contribuíram para minha formação acadêmica.

A secretaria de ensino, principalmente a Taise, pela paciência e agilidade.

A todos os funcionários do Centro que colaboraram na realização deste trabalho.

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, CAPES, CNPq, que nos auxiliaram com a infra-estrutura e recursos financeiros.

“A gente não faz amigos, reconhece-os”.

Vinícius de Moraes

“... por mais que a gente cresça,
há sempre coisas que a gente não consegue entender...”

(Humberto Gessinger)

RESUMO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2002), a esquistossomose é a segunda maior doença tropical, causadora de 200 a 300 mil mortes por ano. Mesmo apresentando alguns quimioterápicos eficazes para o tratamento, como o praziquantel (PZQ) e a oxamniquina (OXQ), ocorrem muitos casos refratários e efeitos colaterais. Diante deste contexto, é necessária a busca racional de novos medicamentos e combinações para o tratamento desta doença. Uma possível solução é o estudo de drogas relacionadas com o estresse oxidativo do patógeno. Dentre estas podem ser analisadas: a artemisinina (ART), que induz uma maior produção de radicais livres por inibição da formação da hemozoína em *Plasmodium falciparum*; a butionina sulfoximina (BSO), que impede a produção da glutatona; além do dietilditiocarbamato de sódio (DDC), que age como inibidor das superóxido dismutases. Portanto, o objetivo deste trabalho foi testar *in vitro* essas drogas, isoladas e combinadas, analisando a atividade das superóxido dismutases, alterações morfológicas e produção de hemozoína em vermes adultos, além de avaliar a toxicidade em esplenócitos. A ART apresentou efeito esquistossomicida em concentrações elevadas. O DDC mostrou um efeito esquistossomicida satisfatório e inibiu as superóxido dismutases. Quanto à associação ART – DDC, esta inibiu a formação da hemozoína, apresentou danos nos tegumentos dos vermes e não apresentou citotoxicidade significativa. Estes resultados indicam que estas drogas são viáveis para estudos *in vivo*, podendo ser uma nova alternativa quimioterápica para esta patologia.

Palavras-chaves: *S. mansoni*, artemisinina, DDC, BSO.

ABSTRACT

According to the World Health Organization (2002), schistosomiasis is the second main tropical disease, causing 200 to 300 thousand deaths per year. Despite presenting some efficacious for the treatment, such as praziquantel (PZQ) and oxamniquine (OXQ), there are many cases refractory and side effects. Given this context, it is necessary a rational search of new drugs and combinations for the treatment of this disease. One possible solution is the study of drug related oxidative stress of the pathogen. Among these may be considered: artemisinin (ART), which induces an increased production of free radicals by inhibiting the formation of hemozoin in *Plasmodium falciparum*, the butionina sulfoximina (BSO), which prevents the production of glutathione, and the sodium diethyldithiocarbamate (DDC) which acts as an inhibitor of superoxide dismutases. Therefore, the objective of this study was to test these drugs *in vitro*, isolated and combined, analyzing the activity of superoxide dismutases, morphological changes and production of hemozoin in adult worms, in addition to evaluate the toxicity in splenocytes. ART had antischistosomal effect at high concentrations. DDC showed an satisfactory effect schistosomicide and inhibited the superoxide dismutases. The combination ART - DDC, it inhibited the formation of hemozoin, showed damage to the tegument of the worms and did not show significant cytotoxicity. These results indicate that these drugs are viable for *in vivo* studies, may be a new chemotherapy alternative for this disease.

Keywords: *S. mansoni*, artemisinina, DDC, BSO.

LISTA DE ABREVIATURAS

AP2 – Ativador da Proteína 2
ART – Artemisinina
BCA – Ácido Biciconinico
BSO – Butionina Sulfoximina
Carboxi-H₂DFCDA – Diacetato de 5-6-Carboxi-2',7'-Diclorodihidrofluoresceína
CEUA - Comitê de Ética no Uso Animal
CREB – Fator de transcrição ligante ao cAMP (Adenina Monofosfato cíclico)
DAPI – Diamidinofenilindol
DDC – Dietilditiocarbamato de sódio
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxiribonucléico
DTNB – 5,5-Ditiobis 2-Nitrobenzoato
EC - Extracelular
ED₅₀ – Dose efetiva capaz de matar 50%
FIC – Fração da Concentração Inibitória
HEPES - N-2-Hidroxietilpiperazina-N'-ácido etano sulfônico
IC₅₀ – Concentração Inibitória de 50%
Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucina
IFN-γ – Interferon gama
LPS – Lipopolissacarídeo
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MHC – Complexo de histocompatibilidade
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazol
NADPH oxidase – Nicotinamida dinucleotídeo fostato oxidase
NF-1 – Fator nuclear 1
NFκ-B – Fator nuclear kappa B
OMS – Organização Mundial de Saúde
PBS – Tampão fosfato de sódio
PMSF – Fenilmetilsulfonilfluoreto

PZQ – Praziquantel

ROS – Espécies reativas de oxigênio

RPMI - Roswell Park Memorial Institute medium

SOD – Superóxido dismutase

TAF – Fator de Transcrição Associado a proteínas que se ligam a sequências de DNA TATA box

TBA – Ácido tiobarbitúrico

TBARS – Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

TGF- β – Fator de crescimento tumoral-beta

Th – T helper

TNF- α – Fator de necrose tumoral-alfa

TPA – 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato

TRIS – Tris (hidróximetil) aminometano

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Epidemiologia	1
1.2 Características do parasito e ciclo de vida	3
1.3 Formas clínicas da esquistossomose	5
1.4 Imunologia	6
1.5 Estresse oxidativo em <i>S. mansoni</i>	7
1.6 Superóxido dismutases	9
1.7 Tratamento	10
2. OBJETIVOS	14
2.1 Geral:.....	14
2.2 Específicos:	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1 Fármaco esquistossomicida	14
3.2 Drogas pró-oxidantes	14
3.3 Reagentes usados para dosagem da atividade das superóxido dismutases	15
3.4 Animais.....	15
3.5 Considerações éticas	15
3.6 Parasitos: infecção e monitoramento <i>in vitro</i>	15
3.7 Extração protéica.....	16
3.8 Quimioluminescência.....	17
3.9 Microscopia eletrônica de varredura - MEV	17
3.10 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos através da técnica do MTT.....	18
3.11 Detecção de espécies reativas	18
3.12 Detecção de tióis totais.....	18
3.13 Detecção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico	19
3.14 Inibição da formação de hemozoína <i>in vitro</i>	19
3.15 Avaliação da desintegração da β -hematina	20
3.16 Análise estatística.....	20
4. RESULTADOS	21
4.1 – Análise <i>in vitro</i> das drogas sobre <i>S. mansoni</i>	21
4.2 – Representação das FIC comparadas às ED ₅₀	25

4.3 – Análise da citotoxicidade	25
4.4 – Avaliação da atividade das superóxido dismutases.....	28
4.5 – Dosagem de hemozoína.....	29
4.6 – Quantificação de β -hematina.....	31
4.7 – Dosagem de peroxidação lipídica.....	32
4.8 – Quantificação de tióis totais.....	32
4.9 – Permeabilização celular e tegumentar.....	33
4.10 – Detecção de espécies reativas.....	36
4.11 – Microscopia eletrônica de varredura.....	38
5. DISCUSSÃO	44
6. CONCLUSÃO	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

A esquistossomose é uma doença infecciosa causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, tendo como principais espécies: *S. mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* (REY, 1991). Esta zoonose é considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS, 2002) como a segunda de maior prevalência na região tropical, depois da malária, causando 200 a 300 mil mortes por ano e atingindo mais de 200 milhões de pessoas no mundo (*loc. cit.* AMARAL et al., 2006). Esta patologia é endêmica em 74 países (Figura 1), sendo que 54 deles apresentam a forma intestinal, que foram registrados principalmente na África, Ásia e países da América do Sul como o Brasil (BERGQUIST 1995; OMS, 2002).

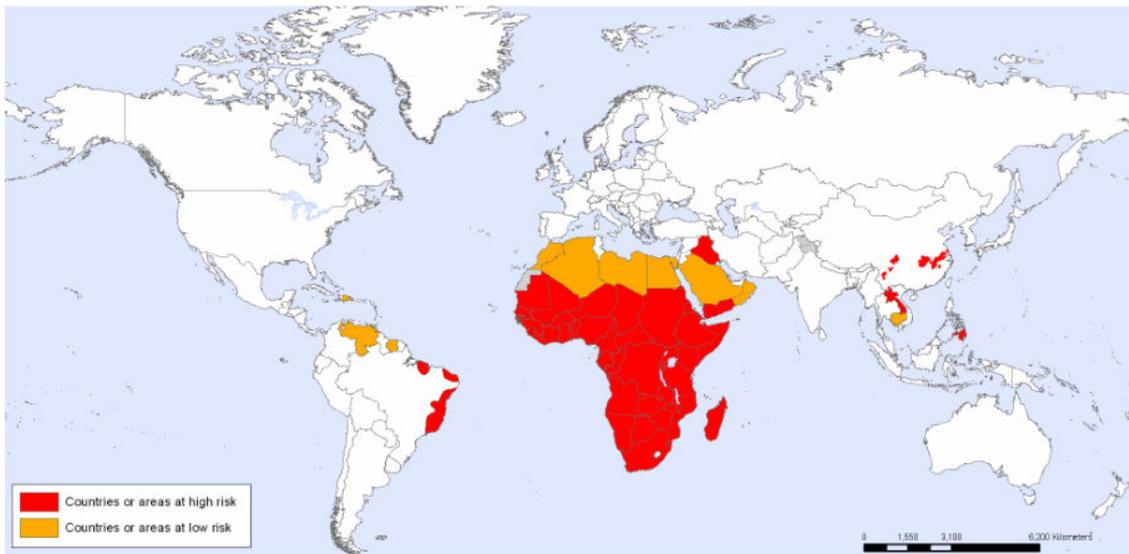


Figura 1: Países ou áreas de risco no mundo (OMS, 2008).

No Brasil há aproximadamente 7 milhões de pessoas com a esquistossomose mansônica (Figura 2). Estima-se que cerca de 5% da população brasileira apresente esta doença. Em estudos epidemiológicos realizados pelo Ministério da Saúde foi demonstrado que a transmissão da esquistossomose ocorre em 19 estados, sendo os mais endêmicos Minas Gerais e Bahia. Os municípios que têm os mais elevados índices de prevalência estão distribuídos por toda a região costeira do Nordeste e

parte no interior da Bahia, como também no sudeste de Minas Gerais (AMARAL et al., 2006; OMS, 2008).

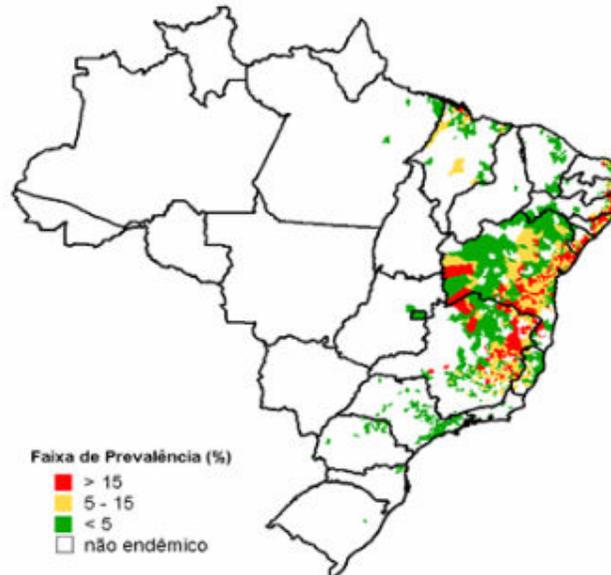


Figura 2: Distribuição da esquistossomose por faixa de prevalência por município no Brasil (Ministério da Saúde, 2004).

Nos estados de Pernambuco e Minas Gerais, os maiores índices de prevalência estão nas comunidades rurais, pois esses locais são habitados por pessoas de baixo poder aquisitivo e desprovidas de saneamento básico (MOZA et al., 1998; GAZZINELLI et al., 2006).

No estado de São Paulo, há uma crescente taxa de incidência desta doença na região nordeste, pois há uma grande emigração de pessoas do nordeste do Brasil para São Paulo e Rio de Janeiro, as quais, por falta de recursos, geralmente vão morar em periferias (MACHADO, 1982; GOZA, 1992; TANNEN, 1992). Desta maneira, vários trabalhos epidemiológicos vêm mostrando que estas condições, favorecidas pelo descaso das políticas estaduais e municipais corrobora ainda mais à infecção, que está relacionada às coleções hídricas contaminadas com material fecal contendo ovos do parasito, dando continuidade ao seu ciclo biológico (CARVALHO et al., 2008).

1.2 Características do parasito e ciclo de vida

A família Schistosomatidae é constituída de trematódeos parasitas, que em sua fase adulta vivem no sistema venoso de mamíferos (REY, 1991). As fases larvares das espécies do gênero *Schistosoma*, são encontradas em moluscos gastrópodes aquáticos, principalmente dos gêneros *Biomphalaria*, *Bulinus* ou *Oncomelania*. Os que fazem parte desta família se diferenciam de outros trematódeos por ter as seguintes características: sexos separados, eliminarem ovos não operculados, com espículo lateral ou terminal, embrionados (com miracídio) e ter como formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (definitivo) as cercárias que penetram por via transcutânea (CARVALHO et al., 2008).

A espécie *S. mansoni*, normalmente realiza o ciclo assexuado em moluscos do gênero *Biomphalaria* (REY, 1991). A morfologia do *S. mansoni* varia de acordo com as fases correspondentes ao seu ciclo biológico: adulto – macho e fêmea, ovo, miracídio, esporocistos, cercária e esquistossômulo.

O macho possui cor esbranquiçada com o tegumento recoberto de projeções denominadas tubérculos, dotadas de espinhos. Já a fêmea não apresenta tubérculos em seu corpo filiforme, são maiores e mais escuras que os machos, devido à maior taxa de ingestão e quebra da hemoglobina que resulta em hemozoína (OLIVEIRA et al., 2000). Ambos apresentam uma porção anterior, onde é observada a ventosa oral e ventral (acetábulo) e a posterior, na qual se encontra o canal ginecóforo apenas no macho, formado pelo dobramento do corpo achatado no sentido longitudinal para alojar a fêmea e fecundá-la (NEVES et al., 2000).

As fêmeas fecundadas produzem, através das glândulas vitelínicas e do ovário, os ovos, que apresentam uma parte mais larga e é observado um espículo lateral ou subterminal em *S. mansoni*. O ovo maduro é identificado quando apresenta um miracídio formado, visível pela transparência dos ovos os quais são encontrados nas fezes (NEVES et al., 2000).

Após entrarem em contato com a água, os ovos liberam o miracídio. Esta fase larvar apresenta uma forma cilíndrica com uma superfície composta por placas epidérmicas ciliadas. Na região anterior, encontra-se uma papila apical em forma de cone (terebratorium) que contém a abertura de glândulas (adesivas e de penetração) com numerosos receptores sensoriais, sendo a partir desta estrutura que ocorre a

fixação e penetração nos gastrópodes do gênero *Biomphalaria* sp. (CARVALHO et al., 2008).

Após a infecção do molusco pelo miracídio, que ocorre preferencialmente no pé e na base das antenas, esta fase larvar sofre várias alterações, como a perda do terebratorium, do epitélio ciliado e do sistema nervoso. Neste estágio, o miracídio contém células germinativas as quais são chamadas de esporocisto-mãe ou primário que consiste em um saco com paredes cuticulares, contendo a primeira geração das células reprodutivas e uma camada superficial contínua com numerosas dobras. Além disso, não possui boca ou sistema digestivo, absorvendo os nutrientes e eliminando suas excretas através do tegumento (NEVES et al., 2000).

Nas paredes do esporocisto primário inicia-se a formação de aglomerado de células germinativas com uma vacuolização acentuada na região central. Estes aglomerados se reorganizam e dão origem a septos, ficando o esporocisto-mãe dividido em 150 a 200 camadas, sendo cada considerada como esporocisto filho ou secundário. Este esporocisto-filho, depois de 5 a 6 dias, abandona o esporocisto-mãe e apresenta fibras musculares, sistema nervoso, protonefrídeos e o seu tegumento semelhante àquele do seu antecessor (CARVALHO et al., 2008).

Com a produção dos esporocistos secundários, no local de penetração do miracídio, estes migram por vários órgãos, como o hepatopâncreas, tendo como destino final tanto as glândulas digestiva e/ou germinativa (NEVES et al., 2000).

Após chegar ao seu destino final, o esporocisto secundário apresenta três partes bem definidas, uma que é o poro de nascimento, a segunda que contém cercárias em várias fases de desenvolvimento e a terceira que apresenta várias células embrionárias ou esporocistos terciários, os quais dão continuidade à produção das cercárias (NEVES et al., 2000).

Com a emergência das cercárias a partir dos moluscos, estas penetram na pele do homem, fixando-se através das ventosas e transpondo a pele por intermédio do movimento vibratório e da ação lítica oriunda das glândulas de penetração. Esta larva possui cauda bifurcada, a qual se perde rapidamente durante o processo de penetração, duas ventosas, uma como a oral e terminações chamadas glândulas de penetração (NEVES et al., 2000).

Com a infecção da pele, através da porção anterior da larva, esta passa a se adaptar e desenvolver em outra forma denominada de esquistossômulo ou fase juvenil. Na circulação sanguínea esta larva sofre significativas mudanças

morfológicas e fisiológicas na transição da forma pulmonar para a hepática (BARBOSA et al., 1978). Quando esta forma atinge o sistema porta ela se desenvolve completamente para verme adulto, onde as fêmeas eliminam o ovo, principal causador da patologia com a formação dos granulomas e que dará continuidade ao ciclo biológico deste parasito (CARVALHO et al., 2008).

1.3 Formas clínicas da esquistossomose

A esquistossomose se manifesta com maior frequência no ser humano sob uma forma aguda e duas formas crônicas polares (hepatointestinal e hepatoesplênica). A forma aguda apresenta uma maior ocorrência, mas de difícil distinção com fase crônica. A hepatointestinal é geralmente assintomática, atingindo a maioria absoluta das pessoas que vivem em áreas de alto risco. A forma hepatoesplênica é rara, apresentando, na maioria dos casos, uma hepatoesplenomegalia e sinais de hipertensão (REY, 1991).

A esquistossomose aguda pode ser caracterizada especialmente pela ocorrência de vários granulomas periovulares com predominante componente exudativo e com muitos eosinófilos, acompanhado de necrose central em vários órgãos, principalmente no fígado, intestinos e pulmões (RASO & NEVES, 1965). Esta necrose pode assumir o aspecto hialino com um precipitado resultante da interação antígeno-anticorpo (KEPHART, ANDRADE & GLEICH, 1988).

A forma aguda apresenta os seguintes sintomas: dores abdominais, insônia, emagrecimento, febre, indisposição, diarreia, tosse, anorexia, sudorese, fadiga, cefaléia, calafrios, dentre outros (NEVES, MARTINS & TONELLI, 1966).

As manifestações clínicas da forma hepatointestinal podem ser decorrentes da associação com outras parasitoses intestinais, problemas alimentares e com o estresse (MEIRA, 1991). Esta forma caracteriza-se por apresentar: fígado impalpável com consistência flácida e superfície lisa, podendo apresentar fibrose periportal; eosinofilia discreta; hipergamaglobulinemia (CARVALHO et al., 2008); endurecimento da alça sigmóide (LOBO, 1947) e formas pseudoneoplásicas avançadas formadas a partir de lesões intestinais (ANDRADE & BINA, 1983).

A sintomatologia desta forma é caracterizada por apresentar muco e estrias sanguíneas nas fezes (PEIXINHO, ANDRÉ & BINA, 1986), dores abdominais, intolerância alimentar, náuseas, insônia, astenia, anorexia, impotência sexual, sudorese e palpitações (CARVALHO et al., 2008).

Na forma hepatoesplênica há uma fibrose periportal causada pela reação antígeno-anticorpo e obstrução dos vasos periféricos com os ovos, principalmente, no fígado e baço, formando os granulomas, tendo como conseqüência a hipertensão portal e hemorragias (NEVES et al., 2000). Os sintomas mais freqüentes são: aumento do abdômen e dores epigástricas (CARVALHO et al., 2008).

Algumas formas clínicas podem ser derivadas da hepatoesplênica como: a cardiopulmonar; pseudoneoplásica que pode ser em decorrência também da forma hepatointestinal e a forma neuroesquistossomótica, derivada também da hepatointestinal (NEVES et al., 2000).

A neuroesquistossomose é a forma mais severa, podendo acometer qualquer parte do sistema nervoso central. É classificada em dois tipos: encefálica e mielorradiculopática, sendo mais freqüente a primeira na esquistossomose japônica e a segunda na mansônica (LAMBERTUCCI, SILVA & AMARAL, 2007).

O comprometimento do paciente na fase neuroesquistossomótica, inicia-se com a chegada dos elementos esquistossomóticos ao sistema nervoso central, pelas conexões do sistema portal com as veias medulares ou cerebrais, ou ainda pela circulação arterial através de fístulas arteriovenosas pulmonares ou anastomoses portopulmonares. A entrada desses elementos resulta nas formas encefálica e medular apresentando endarterite e trombose (PITTELLA, 1985); desmielinização ou degeneração axonal à distância (FERREIRA et al., 1998), bem como a presença rara de vermes adultos (BAMBIRRA et al., 1986).

Os sintomas da forma mais grave da doença são: dor lombar e nos membros inferiores, disfunção urinária e intestinal e impotência sexual (LAMBERTUCCI, SILVA & AMARAL, 2007).

1.4 Imunologia

A resposta imunológica em modelos experimentais como em camundongos, no início da infecção, é caracterizada como do tipo Th1, com produção de IL-2 e IFN- γ , que induz a expressão de MHC-II nos macrófagos, acarretando desta maneira em um recrutamento de linfócitos T CD4⁺ e favorecendo a formação de um ambiente pró-inflamatório em torno dos ovos presentes nos vasos periportais hepatoesplênicos (MORAIS et al., 2002; RUTITZKY, ROSA & STADECKER, 2005).

Após a oviposição, há uma diminuição da resposta imunológica Th1, isto acontece devido ao decréscimo de IFN- γ com um simultâneo aumento da produção de IL-10, que favorece a resposta do tipo Th2 e inibição da Th1. Nestas condições, ocorre um aumento na produção de outras interleucinas por linfócitos Th2, como: IL-13, que induz a formação de colágeno do tipo I e III levando à fibrose hepática em torno dos ovos; IL-4, que modula a produção de IgG para IgE, que favorece a interação eosinófilos-parasito; IL-5, citocina responsável pelo recrutamento de eosinófilos; além da IL-6 que induz a proliferação e maturação de linfócitos B (MORAIS et al., 2002; RUTITZKY, ROSA & STADECKER, 2005).

Apesar de estar caracterizado o perfil imunológico da doença, vários aspectos ainda não estão bem esclarecidos, como a que antígenos a resposta imunológica está dirigida (CARVALHO et al., 2008). Pela atividade de intensos infiltrados granulomatosos em diferentes órgãos é demonstrada a geração de estresse oxidativo na esquistossomose (KAZURA et al., 1985).

1.5 Estresse oxidativo em *S. mansoni*

O estresse oxidativo é definido como um desequilíbrio no status redox de um organismo. Este desequilíbrio é causado pela produção de radicais livres como, por exemplo, ROS, que podem ter origem do metabolismo celular ou pela presença de xenobióticos. Cerca de 1-2% de todo oxigênio consumido na cadeia transportadora de elétrons é convertido a ROS, tais como superóxido. Porém há sistemas mitocondriais redox que participam na conversão destas ROS, principalmente H₂O₂, em água (CIRCU & AW, 2010). Nestes sistemas podem estar presentes as tiorredoxinas, glutationas e peroxiredoxinas, que de maneira geral transferem hidrogênios com ciclos de oxi-reduções entre esses peptídeos, através de seus grupos sulfidrilas, até reagirem com os peróxidos de hidrogênio e por fim, resultando em água. Esta é só uma dentre tantas outras formas de manter a homeostase oxiredutora da célula (MORALES et al., 2009).

Dependendo das concentrações de ROS, estas podem estar provocando peroxidações lipídicas, danos no material genético, oxidações de proteínas e inibição da divisão celular, resultando possivelmente em apoptose, com ativação de caspases por citocromos c e fragmentos de DNA, interferindo na atividade de canais Ca⁺⁺, promovendo descontrole na sinalização e fisiologia celular (OTT et al., 2007; CIRCU & AW, 2010), além da possibilidade de estar interferindo na expressão

protéica iniciada por fatores de transcrição com o NFκ-B e receptores “Toll-like” do tipo 4, que estão intimamente relacionados à produção das superóxidos dismutases (BRADY et al., 1997).

Em humanos, o aumento de ROS tem sido relacionado ao câncer, doenças neurodegenerativas e processos inflamatórios crônicos (DROGE, 2002). Vários parasitos estão intimamente ligados a processos inflamatórios, nos quais aumentam a produção de ROS por parte do hospedeiro e que os patógenos conseguem neutralizar, através do seu sistema antioxidante enzimático, como ocorre no *S. mansoni*.

Em *S. mansoni*, há algumas vias metabólicas que promovem o estresse oxidativo, quando sofrem interferência de drogas. Durante a digestão da hemoglobina ocorre a liberação de grupos ferriprotoporfirínicos que podem promover a produção de grandes quantidades de radicais livres. Estes radicais livres são produzidos principalmente, pela doação de elétrons do ferro do grupo heme para grupos sulfidrilas e peróxidos orgânicos, além de carregá-los, assim, retroalimentando ciclos de produção de ROS. Esses grupos heme são neutralizados pela cristalização, formando a hemozoína, através de ligações de hidrogênio entre os grupos carboxila dos hemes e por meio das ligações iônicas entre o propionato e o Fe^{+++} , porém com o uso de drogas, pode ocorrer a interrupção deste fenômeno (EGAN, 2008).

O desenvolvimento do parasito, de ovo até a forma adulta, requer um metabolismo aumentado e possivelmente há produção de ROS em pequenas concentrações, sendo verificado também simultaneamente, aumento da expressão de enzimas antioxidantes, principalmente da glutathione S-transferase (MEI & LoVERDE, 1997).

Durante a interação parasito-hospedeiro ocorre a produção de ROS por parte dos eosinófilos para destruição dos vermes adultos, principalmente de íon superóxido produzido pela a enzima NADPH oxidase. Assim formando um ambiente desfavorável à sobrevivência do parasito (LoVERDE, CARVALHO-QUEIROZ & COOK, 2004).

1.6 Superóxido dismutases

Em vários trabalhos foi proposto que a SOD está envolvida no processo de dismutação do radical superóxido, assim protegendo o verme *S. mansoni* da morte oxidativa proporcionada pela resposta imune do hospedeiro (HONG et al., 1993).

As superóxido dismutases (oxidoredutase, E. C. 1.15.1.1) é um importante grupo de metaloenzimas descoberto em 1969 por McCord e Fridovich. A SOD realiza a dismutação do íon superóxido produzindo H_2O_2 , H_2O e O_2 a partir do mecanismo de oxirredução realizado pelos metais constituintes do seu sítio catalítico. Este peróxido de hidrogênio pode ser metabolizado e reduzido em H_2O + O_2 por enzimas como as peroxidases e tioredoxinas (OTT et al., 2007).

O grupo das superóxido dismutases apresenta diferentes isoformas, tais como: Cu/Zn (SOD1) que pode ser tanto citossólica (31,2 kDa, com duas subunidades de 16 kDa), quanto extracelular (EC/SOD3 – 30 kDa), ambas apresentando o metal cobre com ação catalítica e o zinco que desempenha um papel estrutural (TRIANA et al., 1995; OURY et al., 1996); SOD característica das mitocôndrias e bactérias que possui o manganês no seu sítio catalítico (SOD2), apresentando geralmente o peso molecular de 40 ou 46 kDa correspondente à sua forma dimérica, ou tendo 110 ou 140 kDa na sua forma trimérica (MICHALSKI, 1996); e a SOD típica de bactérias e de plantas que contém o ferro como metal constituinte do seu sítio ativo (SOD4) e apresenta duas subunidades com peso molecular de 23 ou 24 kDa (MICHALSKI, 1996; SPIEGELHALDER et al., 1993).

Vários estímulos externos podem induzir a um aumento ou diminuição da expressão destas isoenzimas em humanos. Para SOD1, o aumento ocorre na presença de peróxido de hidrogênio, metais pesados, ozônio (YOO et al. 1999), óxido nítrico (FRANK et al. 2000), ácido araquidônico (RAHMAN, CLERCH & MASSARO, 1991) e raios ultravioleta (ISOHERRANEN et al., 1997). A diminuição ocorre na presença de mitomicina (CHO et al., 1997) e fibroblastos (JACKSON, PARISH & HO, 1996).

Para SOD2 o aumento acontece frente as IL-1, IL-4, IL-6 (DOUGALL & NICK, 1991), TNF- α (WONG & GOEDEL, 1988), lipolissacarídeos (LPS) (VISNER et al., 1990) e IFN- γ (HARRIS, 1991), pois estas citocinas e o LPS são ligantes de receptores, como do grupo Toll-Like, que por sua vez acionam fatores de transcrição como NF κ -B e NF-1. O aumento pode ocorrer também com a ativação da proteína

cinase C através de substâncias como o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) que ativa fatores de transcrição (CREB e TAF-1) (KIM et al., 1999).

Para a diminuição da SOD2, são necessários fatores de transcrição como AP2 (ativador da proteína 2) que interagem com as seqüências próximas da extremidade 5' (ZHU et al., 2001), podendo ocorrer também em vários tipos de câncer, pois nesta situação já foi identificada uma metilação em seqüências de uma região intrínseca desta isoforma (HUANG et al., 1997).

Para o aumento de SOD3 é necessária a presença de IFN- γ e TNF- α em pneumócitos alveolares do tipo II de camundongos. Para que ocorra a expressão destas citocinas em níveis elevados é necessária a ativação de NF κ -B (BRADY et al., 1997) e IL1- α (MARKLUND, 1992). Como esta isoforma exerce um papel de proteção a parede endotelial, fatores vasoativos como serotonina, histamina e óxido nítrico, também aumentam os níveis da SOD3 (STRALIN & MARKLUND, 2001). Sua diminuição ocorre frente ao TGF- β em fibroblastos humanos (MARKLUND, 1992).

A SOD1 já foi identificada na região subtegumentar do *S. mansoni* que, aparentemente pode estar ancorada à membrana celular através da sua região glicosilada (HONG et al., 1993).

A região sinalizadora da SOD1 consiste em uma região hidrofóbica que pode servir para o endereçamento no retículo endoplasmático, aonde será glicosilado. Porém, ainda não é bem esclarecido o processo exocítico desta isoenzima. Assim, acredita-se que o verme possui uma via metabólica especializada com enzimas associadas a membranas para se defender contra os danos causados no tegumento, quando entra em contato com radicais livres liberados pelas células do sistema imune do hospedeiro, podendo nesta situação, ser utilizada como a primeira linha de defesa (HONG et al., 1993).

1.7 Tratamento

Nas três últimas décadas houve uma melhoria fundamental na eficiência terapêutica do tratamento contra a esquistossomose mansônica, com a introdução de duas drogas (oxamniquina e praziquantel), que são administradas em dose única, por via oral, apresenta atividade terapêutica elevada e poucos efeitos colaterais, o que permitiu o tratamento de milhões de pessoas infectadas (CARVALHO et al., 2008).

O mecanismo de ação da oxamniquina (Figura 3), 6-hidroximetil-2-isopropilaminometil-7-nitro-1,2,3,4-tetraidroquinolina, está relacionado com a inibição da síntese de ácidos nucleicos, necessitando da sulfantransferase para torná-la ativa, onde esta enzima é encontrada em *S. mansoni* e ausente no homem (SANTOS, ALMEIDA & LEITE, 2006). Porém, apesar deste medicamento ser muito eficaz, é muito caro e apresenta efeitos colaterais.

Os efeitos metabólicos do praziquantel (Figura 3), 2-ciclohexilcarbonil 1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolina-4-1) sobre o *S. mansoni*, são danos tegumentares, aumento da permeabilidade da membrana para o Ca^{2+} , ausência de fosforilação nas subunidades $\alpha 1$ e β de canais de cálcio e bolhas membranosas em esquistossômulos. Porém, em casos de reinfecção, este quimioterápico não é efetivo contra a forma juvenil (esquistossômulo) do parasito, levando ao surgimento de casos refratários à terapia (PICA-MATTOCCIA & CIOLI, 2004).

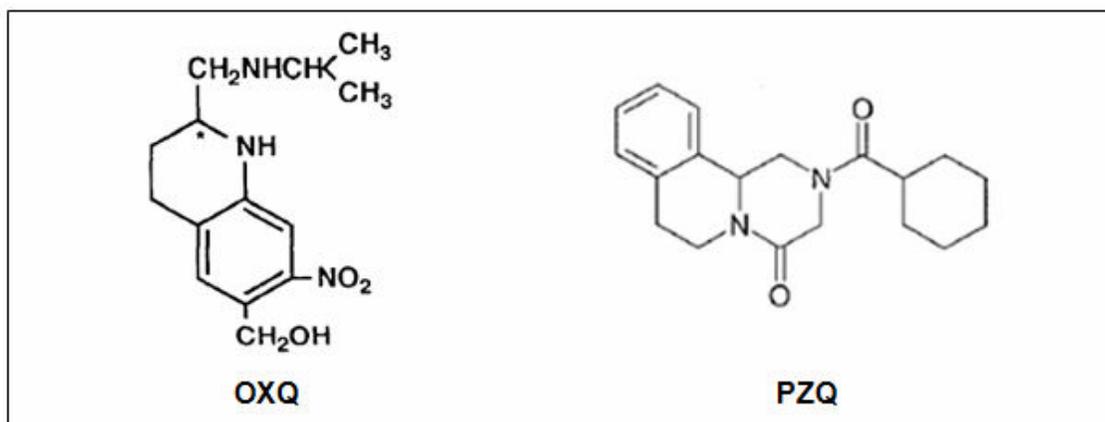


Figura 3: Estruturas químicas da oxamniquina – OXQ – (CIOLI, PICA-MATTOCCIA e ARCHER, 1995) e do praziquantel – PZQ – (KEISER et al., 2006).

Diante desta situação, há a necessidade de buscar novos fármacos para o tratamento desta doença, como também a combinação de quimioterápicos com o intuito de reduzir o custo do tratamento, diminuir a dose (visando reduzir efeitos colaterais), aumentar a eficácia clínica e evitar o surgimento de novas cepas resistentes (CARVALHO et al., 2008).

1.8 Perspectivas para o tratamento

Uma das estratégias promissoras para o alcance deste objetivo é a realização de testes com drogas relacionadas ao estresse oxidativo. Um dos pontos-chave para o estudo dos danos causados por radicais livres é avaliar a interferência de drogas na fase inicial da via de neutralização das ROS, em que a SOD, a tioredoxina glutaciona redutase e a glutaciona - S – transferase estão envolvidas (SAYED et al., 2008; MEI & LoVERDE, 1997)

Um exemplo disso é o uso dos derivados de oxadiazóis, que inibem a multifuncional tioredoxina glutaciona redutase, induzindo a um aumento de NO e de íon superóxido, favorecendo ao desequilíbrio do status redox do *S. mansoni* (SAYED et al., 2008).

Deste modo, a busca racional de inibidores da SOD, principalmente da isoforma Cu/Zn citossólica, a mais estudada em *S. mansoni*, torna-se também viável para a quimioterapia da esquistossomose. Um forte candidato é o DDC (Figura 4), que em alguns trabalhos em outros modelos de estudo, foi demonstrado à inibição por quelação do metal cobre que faz parte do sítio catalítico desta enzima (HEIKKILA, CABBAT & COHEN, 1975).

O DDC é a primeira substância resultante da decomposição do disulfiram no fígado, através do grupo de isoformas do citocromo P450. Quando este medicamento é ingerido simultaneamente com o álcool, inibe a aldeído desidrogenase, aumentando os níveis de acetaldeído e assim causando aversão a bebidas alcoólicas (RANG et al., 2004; MADAN & FAIMAN, 1995).

A ART (Figura 4) é uma lactona sesquiterpênica sintetizada na planta *Artemisia annua*, que é usada contra a malária (OLSSON et al., 2009) e realiza a inibição da formação da hemozoína por intermédio do seu grupo endoperóxido ligante a grupos heme, aumentando nestas condições, os níveis de radicais livres em *Plasmodium falciparum* (PANDEY et al., 1999). Além disso, Ludwig e colaboradores (2003) apresentaram evidências que a ART inibe Ca^{++} - ATPase de *P. falciparum* por ativação do ferro e portanto, podendo atuar de maneira similar por estas duas vias no *S. mansoni*.

Outro alvo para uma nova abordagem quimioterápica é através da inibição da enzima γ -glutamilcisteína sintetase, fundamental para a via metabólica de formação

da glutathione (GRIFFITH & MEISTER, 1979), que quando inibida pela BSO (Figura 4), pode aumentar os níveis de radicais livres no verme, levando-o à morte.

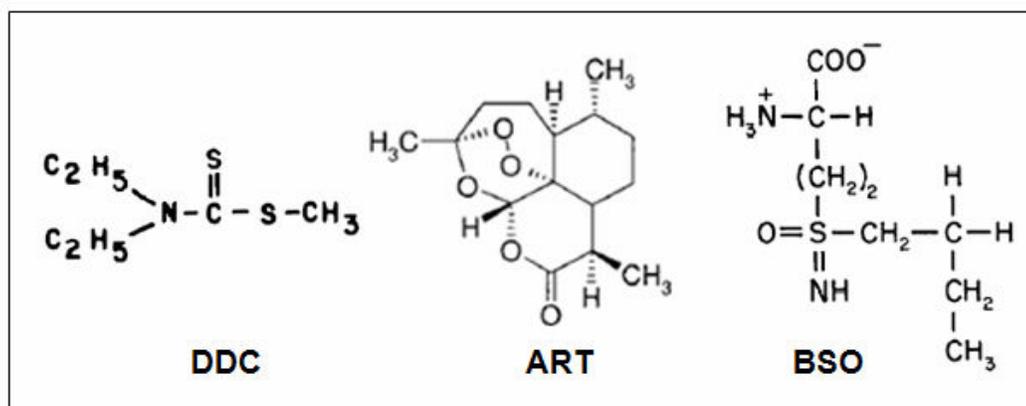


Figura 4: Estruturas químicas do DDC (ENEANYA et al., 1981), ART (KEISER et al., 2006) e da BSO (GRIFFITH & MEISTER, 1979).

Vale ressaltar a importância de proteínas que participam do status redox do parasito como alvo quimioterápico, mas também para produção de vacinas, como as tetraspaninas que induziram a uma redução de ovos fecais de 65 a 69% quando utilizadas como antígenos, demonstrado por Tran e colaboradores (2006). Enzimas como a SOD (citossólica) e a glutathione – S – transferase (28 KDa) são promissoras como antígenos, pois proporcionam um aumento de 39% para imunização contra *S. mansoni* em ratos além de 40 e 60% de redução da carga parasitária, respectivamente (LoVERDE, CARVALHO-QUEIROZ & COOK, 2004; ANGELI et al., 2001).

Através da intervenção destes quimioterápicos combinados, tem-se por um lado, um aumento dos níveis de ROS, utilizando a ART e por outro, o bloqueio do sistema antioxidante com o uso da BSO e do DDC, que poderiam ser utilizados como uma nova estratégia terapêutica conjuntamente ou não a antígenos, contra a esquistossomose.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral:

Avaliar os efeitos da ART, BSO e DDC no status redox, topografia e sobrevivência *in vitro* do *S. mansoni*.

2.2 Específicos:

- Dosar as atividades das superóxido dismutases por quimioluminescência de vermes adultos sobre o efeito dos fármacos isolados e combinados;
- Avaliar a citotoxicidade das drogas em estudo através da dosagem da produção de formazan em esplenócitos;
- Quantificar peroxidação lipídica através da determinação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS);
- Detectar espécies reativas de oxigênio através da sonda carboxi -H₂DCFDA;
- Quantificar grupamentos tióis totais, pelo ensaio de 5,5'-ditio-bis (2 - ácido nitrobenzólico);
- Avaliar alterações nos vermes tratados através da microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Quantificar hemozoína do regurgitado tratados com as drogas;
- Avaliar a destruição da β-hematina na presença das drogas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fármaco esquistossomicida

Praziquantel® foi gentilmente cedido pela Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro (Fiocruz – Manguinhos).

3.2 Drogas pró-oxidantes

Artemisinina foi obtida da Sigma-Aldrich; Dietilditiocarbamato de sódio e a Butionina sulfoximina foram obtidas da Sigma-Aldrich.

3.3 Reagentes usados para dosagem da atividade das superóxido dismutases

Lucigenina e a Hipoxantina (nitrato de bis-*N*-metilacridínio) foram obtidos da Invitrogen e a xantina oxidase foi fornecida pela Sigma-Aldrich.

3.4 Animais

Camundongos Suíços (*Mus musculus*, fêmeas de 6-8 semanas) foram criados e mantidos no biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Salvador, Ba).

3.5 Considerações éticas

Todos os procedimentos envolvendo manipulação de animais experimentais foram realizados, rigorosamente, segundo os princípios preconizados pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz-RJ de acordo com a Lei Sergio Arouca 11.794 de 2008. Tendo o projeto sido aprovado pelo comitê supracitado com o número de licença 023/09.

3.6 Parasitos: infecção e monitoramento *in vitro*

Todos os métodos de infecção e monitoramento *in vitro*, foram realizados segundo Ramirez et al. (2007) com algumas modificações. Cercárias de *S. mansoni*, da cepa Feira de Santana, foram inoculadas (200/200 µL) no quadrante abdominal, próximo à pata esquerda traseira dos camundongos. Após aproximadamente 45 dias, foram sacrificados os camundongos infectados, com retirada de sangue do ventrículo esquerdo do coração, para posterior alimentação dos vermes *in vitro*, extraindo os vermes manualmente dos vasos mesentéricos, e imersos em meio RPMI 1640 (10,4g/L) com: 2% de glutamina, 5,26% de soro fetal bovino, 0,2% de bicarbonato de sódio, 0,48% de HEPES e o dobro da concentração utilizada de antibióticos (10 unidades/mL-penicilina/0,01%estreptomicina e 0,05%-gentamicina).

Terminada a retirada, os vermes foram lavados com o mesmo meio, realizando uma troca de meio gradativa para meio com a concentração de antibióticos indicada pelo fabricante (5 unidades/mL-penicilina/0,005% estreptomicina e 0,025%-gentamicina). Enquanto isso, o sangue retirado foi centrifugado uma vez com citrato de sódio a 0,89% e mais três com citrato de sódio

a 12%, sendo estas centrifugações a 1500 rpm por 15 minutos, resultando em uma solução contendo hemácias. Segundo Pica-Mattocia & Cioli (2004), foi utilizado como controle positivo o praziquantel, com uma concentração final de 5,15 μM (ED_{50} – Dose efetiva capaz de matar 50% dos parasitos - quando é utilizado para casais).

Durante o tratamento *in vitro* os vermes foram colocados em placas de 24 poços contendo o meio RPMI 1640 com diferentes concentrações das drogas. O teste foi realizado com no mínimo três casais de vermes adultos para cada situação. Após todo o procedimento, os vermes foram mantidos na estufa com 5% de CO_2 a uma temperatura de 37°C.

Para avaliação dos efeitos das drogas, por no mínimo 5 dias de monitoramento, foram observados nos vermes, a diminuição da motilidade e mudanças morfológicas, tendo sido convencionada uma escala de 0 – 4 (4 = normalmente ativo; 3 = pouca motilidade; 2 = mínima motilidade, com movimentos raros das partes posterior e anterior; 1 = apresentando motilidade apenas de fluidos internos; 0 = total ausência de motilidade), utilizando para representação dos ensaios a escala de zero.

Outro critério para avaliação dos efeitos esquistossomicidas, foi o uso do diamidinofenilindol (DAPI) a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ em PBS (0,01M, pH = 7,2), incubando as amostras após apresentar motilidade igual a 0, por no máximo 40 minutos. Em seguida foram observadas em microscópio de fluorescência Olympus BX51 numa faixa de comprimento de onda de 330 – 385 nm. Esse intercalante de DNA foi utilizado para distinguir os vermes mortos que emitiram fluorescência azul, seguindo o método descrito por VAN DER LINDEN & DEELDER (1984).

3.7 Extração protéica

Todo o procedimento de extração, precipitação e diálise foi realizado segundo Hong et al. (1992), com algumas modificações. Os vermes foram incubados por três horas com e sem as drogas (EL-BASSIOUNI et al., 2007), retirados do meio RPMI 1640, pesados e imersos em solução salina tamponada com fosfato (PBS - 0,01 M, pH 7,2) na proporção de 1 g/5 mL, eventualmente estocados em nitrogênio líquido. Foi adicionado fluoreto de metilfenilsufonila (PMSF - inibidor de proteases) ao PBS na concentração final de 1 mM e as amostras foram ultrassonicadas em gelo, três vezes de 30 segundos com amplitude de 80% e intervalos de 5 segundos. Em

seguida as amostras foram centrifugadas a 5.000 x g a 4°C por 20 minutos e destas retiradas o sobrenadante.

O sobrenadante foi precipitado com sulfato de amônio, adicionando 50, 65 e 90% deste reagente e centrifugando após cada adição a 4.000 x g por 15 minutos (4°C), sempre removendo o precipitado em cada passo. Para então retirar o sulfato de amônio das amostras, estas foram dialisadas por 18 horas a 4°C com três mudanças de 1 L PBS 10 mM (pH 7,4), em membrana de diálise com poros de tamanho correspondente a 12,4 kDa.

As proteínas totais do sobrenadante foram quantificadas por intermédio do ácido bicinconínico (BCA), segundo Hill & Straka (1987).

3.8 Quimioluminescência

A atividade da SOD foi analisada pelo método da quimioluminescência, como descrito por Corbisier, Houbion e Remacle (1987), com algumas modificações. Os vermes foram incubados com as drogas isoladas e combinadas (40 casais para cada condição) por 3 horas. Após a incubação, foi realizada a extração protéica conforme o tópico 3.7. As amostras (300 µL), obtidas da extração protéica, foram colocadas em uma placa de Petri na qual foram adicionadas: xantina oxidase (0,0084 unidades), hipoxantina (100 µM), lucigenina (20 µM) e PBS a 10 mM e com pH 7,4, sendo todas estas, concentrações finais. A xantina oxidase reagiu com a hipoxantina produzindo ácido úrico, peróxido de hidrogênio e o íon superóxido, sendo que este último reagiu com a superóxido dismutases das amostras e a lucigenina. O íon superóxido não dismutado reage com a lucigenina, resultando em um produto fluorescente, a N-metilacridona. Portanto, a atividade das superóxido dismutases foi quantificada pela inibição da produção de N-metilacridona, ou seja, pelo decaimento de fótons por micrograma de proteínas.

3.9 Microscopia eletrônica de varredura - MEV

O processamento dos vermes para MEV foi realizado de acordo com Liang et al. (2002), com algumas alterações. Primeiramente os helmintos foram fixados em solução de 2,5% de glutaraldeído, 4% de paraformaldeído em 0,1M de tampão cacodilato de sódio, pH 7,2. A seguir, foi realizada a desidratação em série crescente com acetona (15-100%), utilizando, em seguida, o método de secagem

pelo ponto crítico em um aparelho Balzers. Após a desidratação e retirada da acetona, as amostras foram metalizadas com uma camada de 20nm de ouro e observadas em um microscópio eletrônico de varredura Jeol.

3.10 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos através da técnica do MTT

Para determinar se uma droga é citotóxica foi necessário utilizar o método de Mosmann (1983), com algumas alterações. Esplenócitos (1×10^7) foram incubados por 24 e/ou 48 horas em diferentes concentrações das drogas em meio RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino, 0,08% de gentamicina, 10 unidades/mL de penicilina e 0,01% de estreptomicina. Em seguida foi adicionada a solução de MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium 10% em PBS, pH=7,4, na proporção de 1/10 e as amostras foram incubadas ao abrigo da luz. Em seguida, foram centrifugadas por 10 minutos a 3.000 rpm e por fim, adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) em uma proporção de 1:1. A produção de formazan pela redução do MTT foi determinada pela absorbância do sobrenadante, em espectrofotômetro VersaMax a 540 ou 570 nm.

3.11 Detecção de espécies reativas

Vermes adultos de ambos os sexos, incubados com diferentes concentrações das substâncias por 2 ou 5 dias e não tratados, foram imersos em RPMI 1640 contendo diacetato de 5-6-carboxi-2',7'-diclorodihidrofluoresceína (carboxi- H_2DFCDA - Invitrogen) à $1 \mu\text{g/mL}$ a 37°C por aproximadamente 30 minutos. Após a marcação, as amostras foram observadas em microscópio de fluorescência Olympus BX51 numa faixa de comprimento de onda de 460-495 nm. Todo este procedimento foi realizado de acordo Corrêa Soares e colaboradores (2009), com algumas alterações.

3.12 Detecção de tióis totais

Todo este procedimento foi realizado segundo Corrêa Soares et al. (2009) e Sedlack & Lindsay (1968), com algumas modificações. Primeiramente os vermes machos tratados ou não por 3 horas com várias concentrações das drogas (EL-BASSIOUNI et al., 2007), 48 para cada condição, foram imersos em PBS com PMSF

(1 mM), tendo 5 g de verme para cada 1mL deste tampão com inibidor, macerados 10 vezes e ultrassonicados em seguida em gelo, quatro vezes de 30 segundos com amplitude de 80% e intervalos de 5 segundos, resultando no chamado “homogenato”. Em seguida os homogenatos foram centrifugados por 2 minutos a 4000 rpm, retirando-se o sobrenadante. Aliquotas de 50 µL do sobrenadante foram adicionadas em 150 µL de tampão TRIS a 200 mM, pH 8,2, 10 µL de 5,5-ditiobis 2-nitrobenzoato (DTNB – 10 mM) e 100 µL de metanol a 100%. O branco, sem o homogenato e com o DTNB foi preparado da mesma maneira que das amostras.

O branco e todas as amostras foram incubados a 25°C por 15 minutos. Após este passo, as amostras foram centrifugadas a 3.000 x g e o sobrenadante foi usado para quantificar tióis totais, pela absorbância lida a 412 nm em espectrofotômetro VersaMax.

3.13 Detecção de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico

Este método foi realizado segundo Corrêa Soares et al. (2009), com algumas alterações. Amostras correspondendo a 150 µL do sobrenadante do homogenato de vermes macho e 150 µL de soluções com concentrações crescentes de malonaldeído foram adicionadas a 200 µL de 1% de ácido tiobarbitúrico (TBA) em 50% de ácido acético. As amostras foram incubadas a 100°C por 15 minutos e em seguida colocadas em gelo, adicionando 500 µL de η-butanol. Após a incubação, foram centrifugadas a 13.400 rpm por 15 minutos em temperatura ambiente e o sobrenadante foi utilizado para medir a quantidade de TBARS com base na absorbância lida a 532 nm em espectrofotômetro VersaMax.

3.14 Inibição da formação de hemozoína *in vitro*

O método para quantificação dos cristais da hemozoína, foi realizado segundo Ncokazi e Egan (2005), Egan, Mavuso e Ncokazi (2001) e Corrêa Soares et al. (2009).

Aproximadamente 150 vermes adultos fêmeas foram separados e imersos em 1 mL de água deionizada a temperatura ambiente por 80 minutos, agitando gentilmente a cada 5 minutos. Em seguida o precipitado foi descartado e o sobrenadante, denominado de regurgitado, foi coletado e armazenado em nitrogênio

líquido. A quantificação de proteínas do regurgitado foi realizado segundo o método de Lowry et al. (1951), utilizando como padrão a albumina bovina.

Alíquotas do regurgitado, contendo 30 µg de proteínas totais, foram incubadas a 37°C por 18 horas com tampão acetato de sódio 0,5 M (pH 4,8), hemina a 100 µM em NaOH a 0,1M e várias concentrações das drogas, para um volume final de 170 µL.

Após o período de incubação, foram adicionados 80 µL de solução de piridina a 30% em HEPES a 20 mM, pH 7,5 e as amostras foram mantidas por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida 38 µL do sobrenadante foram transferidos para outra placa de 96 poços com 250 µL da mesma solução de piridina supracitada. Por fim, esta última placa foi usada para quantificar grupos heme livres, lendo a absorbâncias das amostras em espectrofotômetro VersaMax a 405 nm. A quantidade de hemozoina foi determinada, subtraindo a quantidade de heme adicionada às amostras dos valores encontrados do grupo experimental.

Foi utilizada a hemina como padrão para quantificação de hemes livres.

3.15 Avaliação da desintegração da β-hematina

A técnica de quantificação de β-hematina foi realizada segundo Ncokazi e Egan (2005), com algumas modificações. A β-hematina, 68 µL, cedida gentilmente pelo grupo do laboratório de bioquímica redox da UFRJ, foi incubada em tampão acetato a 0,5 M, pH 4,8, com várias concentrações das drogas, resultando num volume final de 170 µL. Em seguida, as amostras e o branco, com apenas tampão acetato, foram incubados a 37°C por 18 horas.

Após o período de incubação, todas as condições foram diluídas da mesma maneira que o método do tópico anterior e, em seguida foi realizada a leitura da absorbância de hemes livres com o uso do espectrofotômetro VersaMax a 405 nm. A quantidade de β-hematina foi determinada, através da absorbância de grupos heme livres. Foi usada como padrão, a hemina para medir a quantidade de grupos heme livres.

3.16 Análise estatística

O teste estatístico utilizado foi o de Tukey-Kramer de múltipla comparação, para verificar se as diferenças entre as médias eram significativas considerando o

desvio padrão, ou se $p < 0,05$, empregando o programa GraphPad© Prism 4.0 e 5.0. Para a determinação da ED_{50} das drogas em estudo, foi utilizada a análise de sobrevivência Probit, com o método de Finney (distribuição-lognormal), disponível no programa BioStat© 2008.

A construção do gráfico “representação das FIC comparadas às ED_{50} das drogas isoladas”, foi realizado segundo Tamez et al. (2005).

Todos os experimentos foram realizados em triplicatas e o número de repetições está representado como “n” nos resultados.

4. RESULTADOS

4.1 – Análise *in vitro* das drogas sobre *S. mansoni*

Esta etapa do trabalho foi realizada com o intuito de determinar as ED_{50} das substâncias isoladas, para assim, construir os experimentos em combinação.

Foi observado que a BSO não apresentou atividade esquistossomicida satisfatória com relação às concentrações avaliadas, não sendo utilizada para os demais experimentos (Figura 5), exceto em associação com a ART (Figura 6). A ED_{50} calculada para a BSO nos experimentos realizados foi de $1,8 \pm 0,5$ mM e na concentração de 2 mM foi observada uma atividade esquistossomocida de 50%, 17% sobre as fêmeas e 33% sobre os machos.

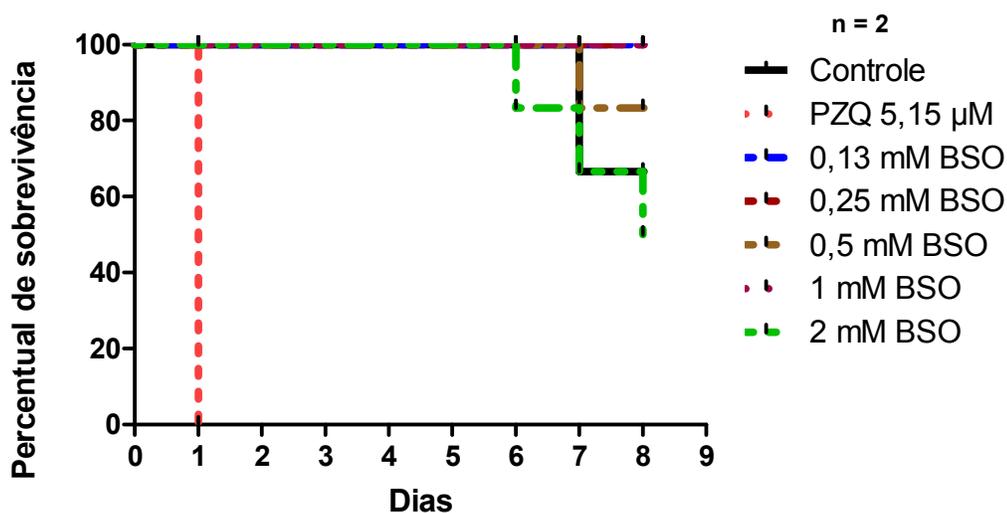


Figura 5: Curva de sobrevivência dos vermes adultos tratados com diferentes concentrações da BSO.

De acordo com o gráfico abaixo (Figura 6), foi observado que o DDC possui uma atividade sobre os vermes em todas as concentrações testadas da droga, apresentando uma ED_{50} de $69 \pm 24 \mu\text{M}$, apresentando uma mortalidade de 100% dos machos para a concentração de $160 \mu\text{M}$ e para as fêmeas 67%.

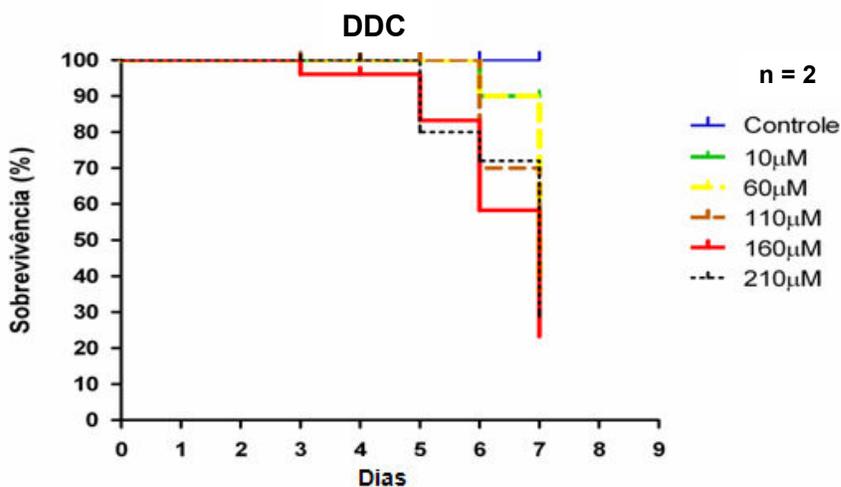


Figura 6: Tratamento de vermes adultos com diferentes concentrações do DDC para determinação do ED_{50} .

Segundo a curva de sobrevivência abaixo (Figura 7), é possível verificar um efeito helminticida considerável a partir da concentração de $0,707 \text{ mM}$ da ART. Com os ensaios realizados, foi obtida uma ED_{50} de $582 \pm 124 \mu\text{M}$ para a ART e para a condição de $707 \mu\text{M}$ apresentou um efeito sobre os vermes adultos entre 50 e 84%, não sobrevivendo entre 17 e 50% dos machos e 34% das fêmeas.

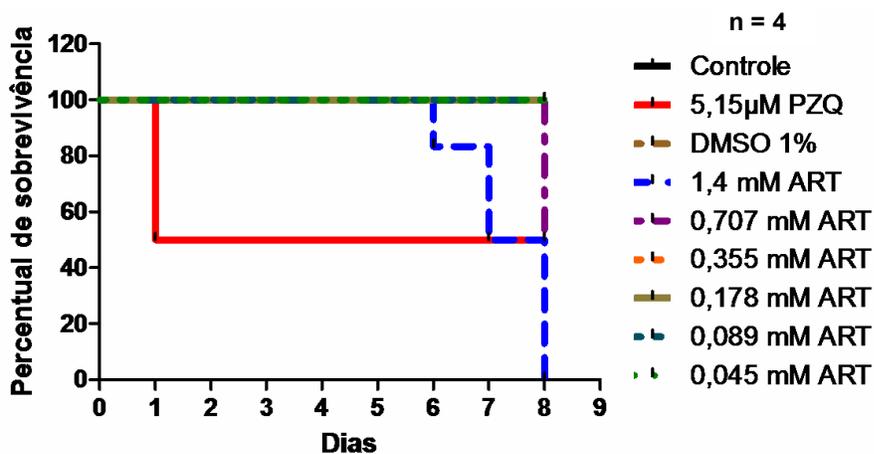


Figura 7: Percentagem de mortalidade dos vermes adultos em diferentes concentrações da ART.

Nos experimentos realizados com a combinação ART - BSO (Figura 8), é possível sugerir que o efeito esquistossomicida é observado quando há aumento da concentração da ART e para a condição de 126 μM ART + 250 μM BSO, não sobreviveram 64%, com morte de 38% para as fêmeas e 26% para os machos.

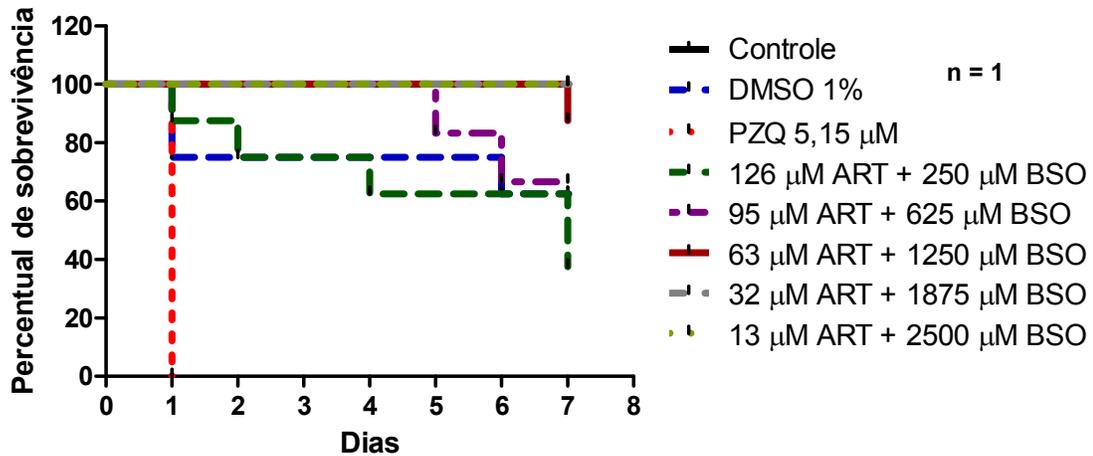


Figura 8: *Screening* do efeito esquistossomicida da combinação ART – BSO.

Com o *screening* realizado, foi verificado que a condição de 126 μM ART + 6,9 μM DDC apresentou maior mortalidade dos vermes. Portanto, esta combinação apresentou uma atividade esquistossomicida significativa, quando comparada à combinação da ART – BSO e às drogas isoladas, assim, o trabalho foi direcionado para esta associação (Figura 9). Para a condição de 126 μM ART + 7 μM DDC foi verificado que não sobreviveram 84% dos vermes, destes, 50% sobre os machos e 34% sobre as fêmeas.

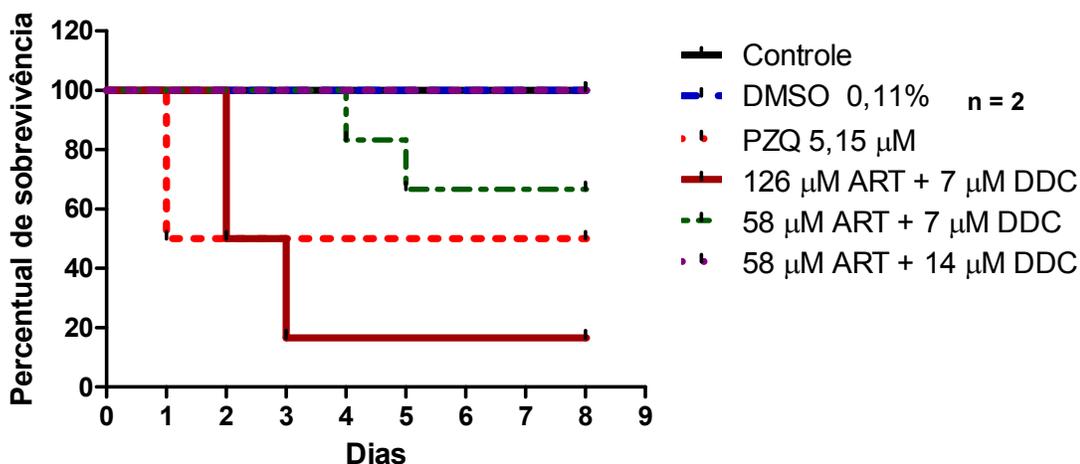


Figura 9: Curva de sobrevivência dos vermes adultos tratados com diferentes concentrações da combinação ART-DDC.

A partir do *screening* representado no gráfico anterior, foram determinadas quatro FIC (fração da concentração inibitória) da condição de maior efeito sobre o *S. mansoni*, conforme a curva de sobrevivência abaixo (Figura 10). Neste experimento, a ED₅₀ da ART foi de 89 μM e para o DDC foi de 5 μM e na condição de 126 μM ART + 7 μM DDC foi verificada uma mortalidade de 64%, sendo 32% tanto para os vermes machos quanto para as fêmeas.

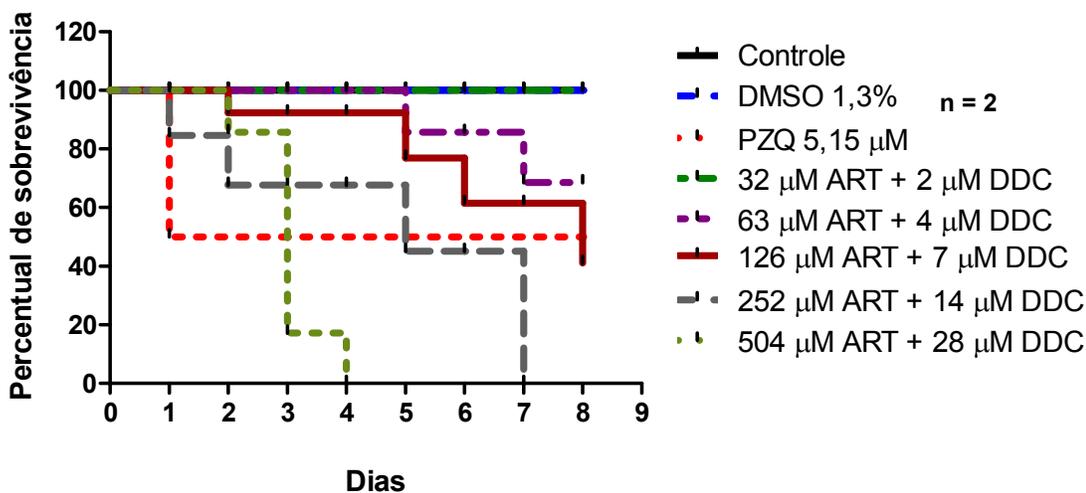


Figura 10: Curva de sobrevivência de vermes adultos com base na condição 126 μM + 6,9 μM DDC.

4.2 – Representação das FIC comparadas às ED₅₀

Segundo o gráfico abaixo (Figura 11), é possível sugerir que é altamente sinérgica a combinação nas concentrações avaliadas da curva de sobrevivência anterior.

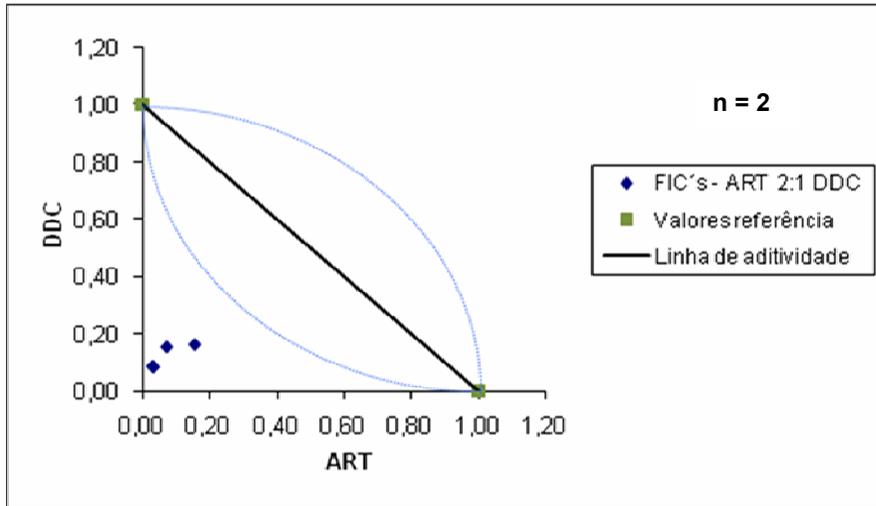
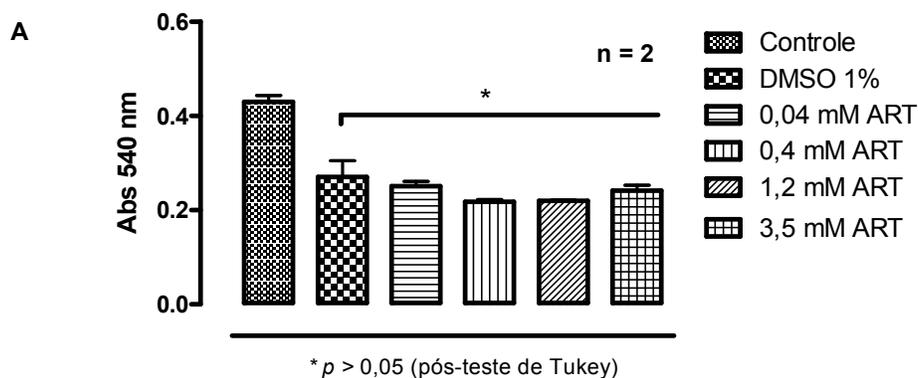


Figura 11: Representação das FIC₁₆, FIC₅₀, FIC₈₄, e FIC₁₀₀ da combinação, comparadas à divisão das ED₁₆, ED₅₀, ED₈₄ e ED₁₀₀ das drogas isoladas sobre as mesmas (1 - valores referência).

4.3 – Análise da citotoxicidade

A ART com 24 e 48 horas, não apresentou toxicidade nas concentrações avaliadas em esplenócitos (Figura 12).



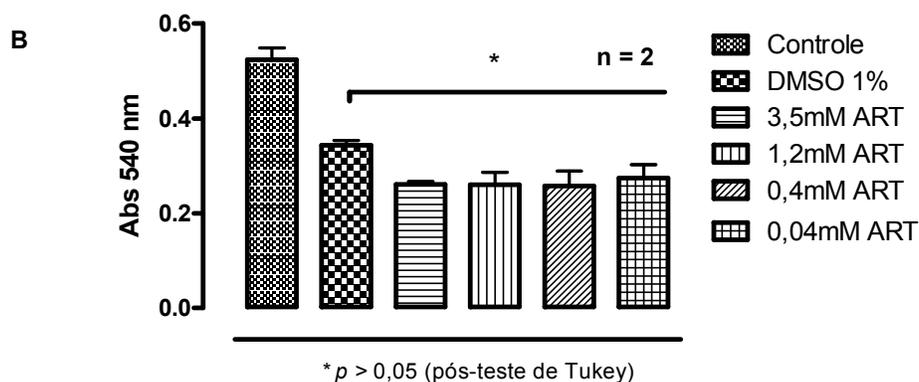


Figura 12: Avaliação da citotoxicidade de diferentes concentrações da ART em 24 (A) e 48 (B) horas, respectivamente.

A BSO apresentou toxicidade a partir da concentração de 1,25 mM com 24 h em esplenócitos. A IC_{50} (concentração inibitória de 50%) da BSO calculada foi de $2,8 \pm 0,27$ mM (Figura 13).

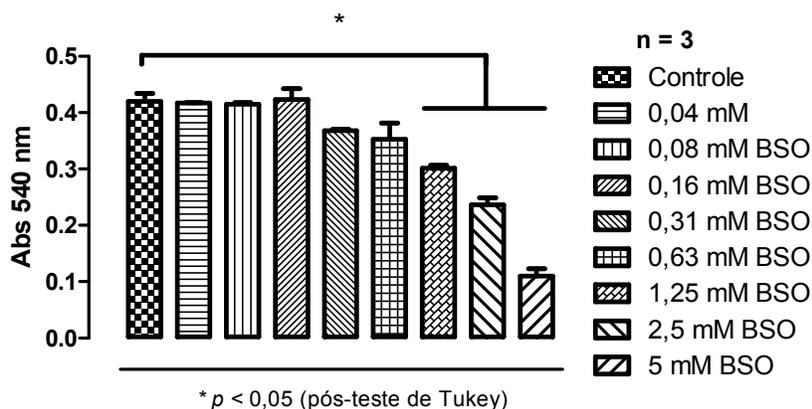


Figura 13: Avaliação da citotoxicidade de diferentes concentrações da BSO em 24 horas.

A combinação de ART – DDC na condição de maior efeito esquistossomicida no *screening*, não foi tóxica para esplenócitos em 24 e 48 horas (Figura 14).

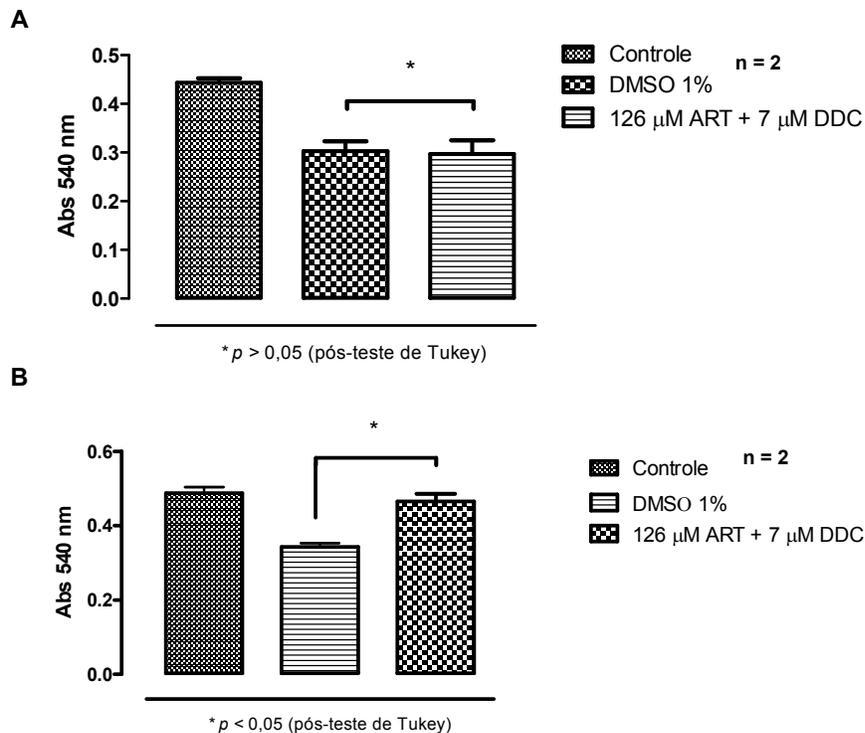
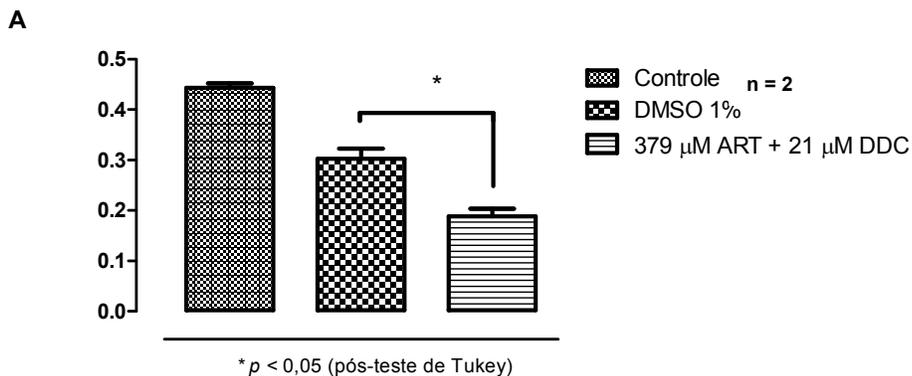


Figura 14: Avaliação da toxicidade da combinação ART – DDC em esplenócitos com 24 (A) e 48 (B) horas, respectivamente.

Para a combinação de ART – DDC, com a concentração de 379 μM ART + 21 μM DDC, foi observado que esta apresentava uma diferença de 38% comparada com o DMSO a 1% em 24 horas e em 48 horas, apresentou uma diferença de 42% (Figura 15).



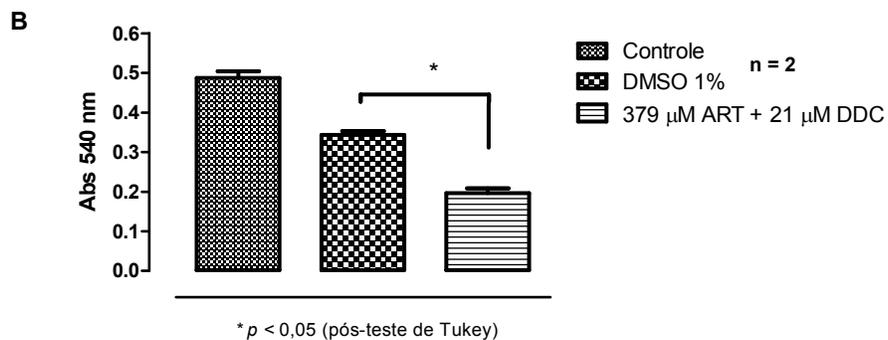
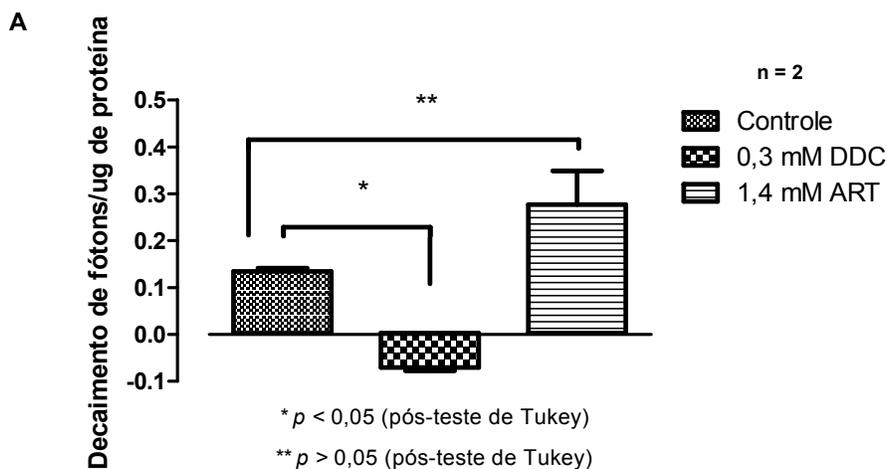


Figura 15: Avaliação da toxicidade da combinação ART – DDC em esplenócitos com 24 (A) e 48 (B) horas, respectivamente.

4.4 – Avaliação da atividade das superóxido dismutases

Através da técnica de quimioluminescência foi possível verificar que o DDC isolado, inibiu totalmente a atividade e/ou expressão das superóxido dismutases, quando comparado ao controle. Já ART não interferiu na atividade e/ou expressão das superóxido dismutases. Porém quando combinadas, estas modularam positivamente a atividade e/ou expressão das metaloenzimas (Figura 16).



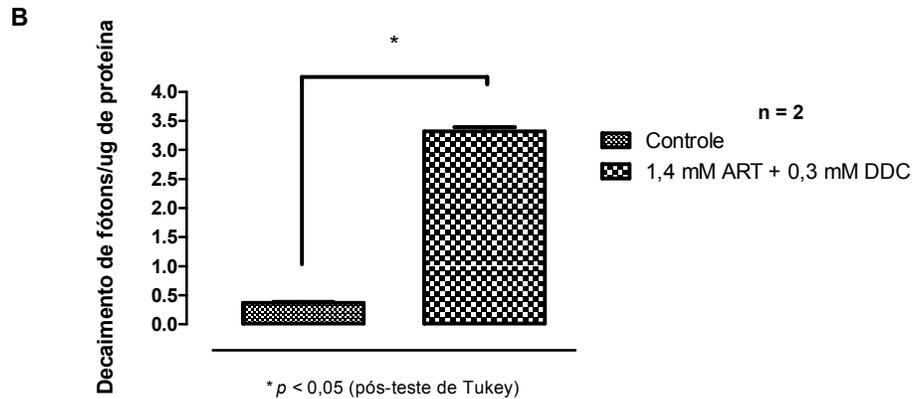


Figura 16: Atividade das superóxido dismutases de vermes adultos tratados com ART e DDC isoladas (A) e combinadas (B), respectivamente.

4.5 – Dosagem de hemozoína

Nos experimentos para quantificação de hemozoína foi verificado que a ART apresentou uma inibição na cristalização de grupos heme nas concentrações de 45 - 707 μM , quando comparado ao grupo controle e, quando esta é comparada ao DMSO 1%, é perceptível que há um aumento na produção de hemozoína (Figura 17).

Para o DDC, foi observado que houve uma inibição na formação de hemozoína, ocorrendo também na combinação, porém, com inibição de 100% (Figura 17).

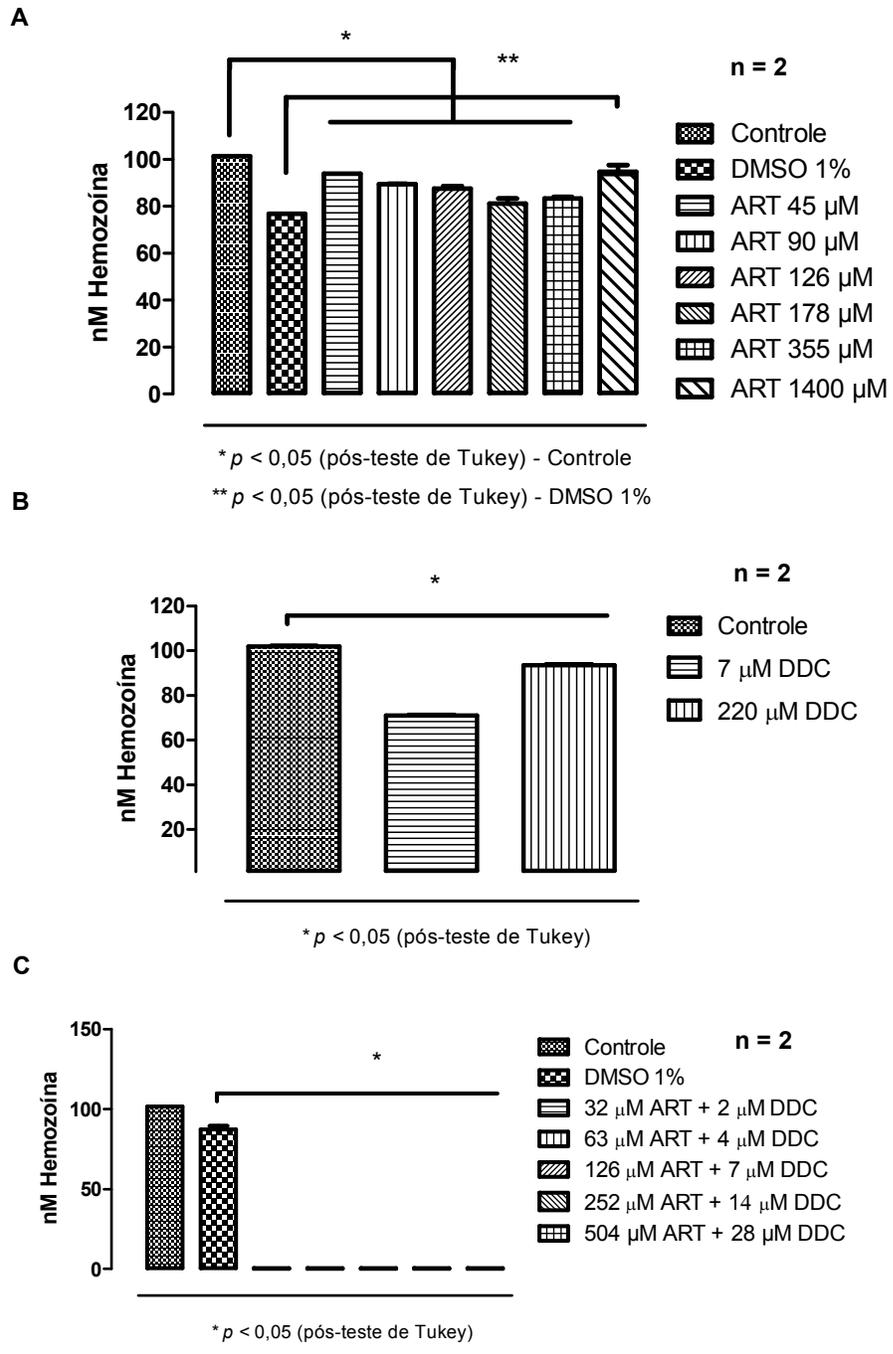


Figura 17: Quantificação da hemozoína do regurgitado de fêmeas tratado com as drogas isoladas (A e B) e combinadas (C), respectivamente.

4.6 – Quantificação de β -hematina

Nos ensaios realizados com a ART e a combinação ART – DDC, não foi observada desintegração da β -hematina. Porém para o DDC foi observada a destruição de β -hematina (Figura 18).

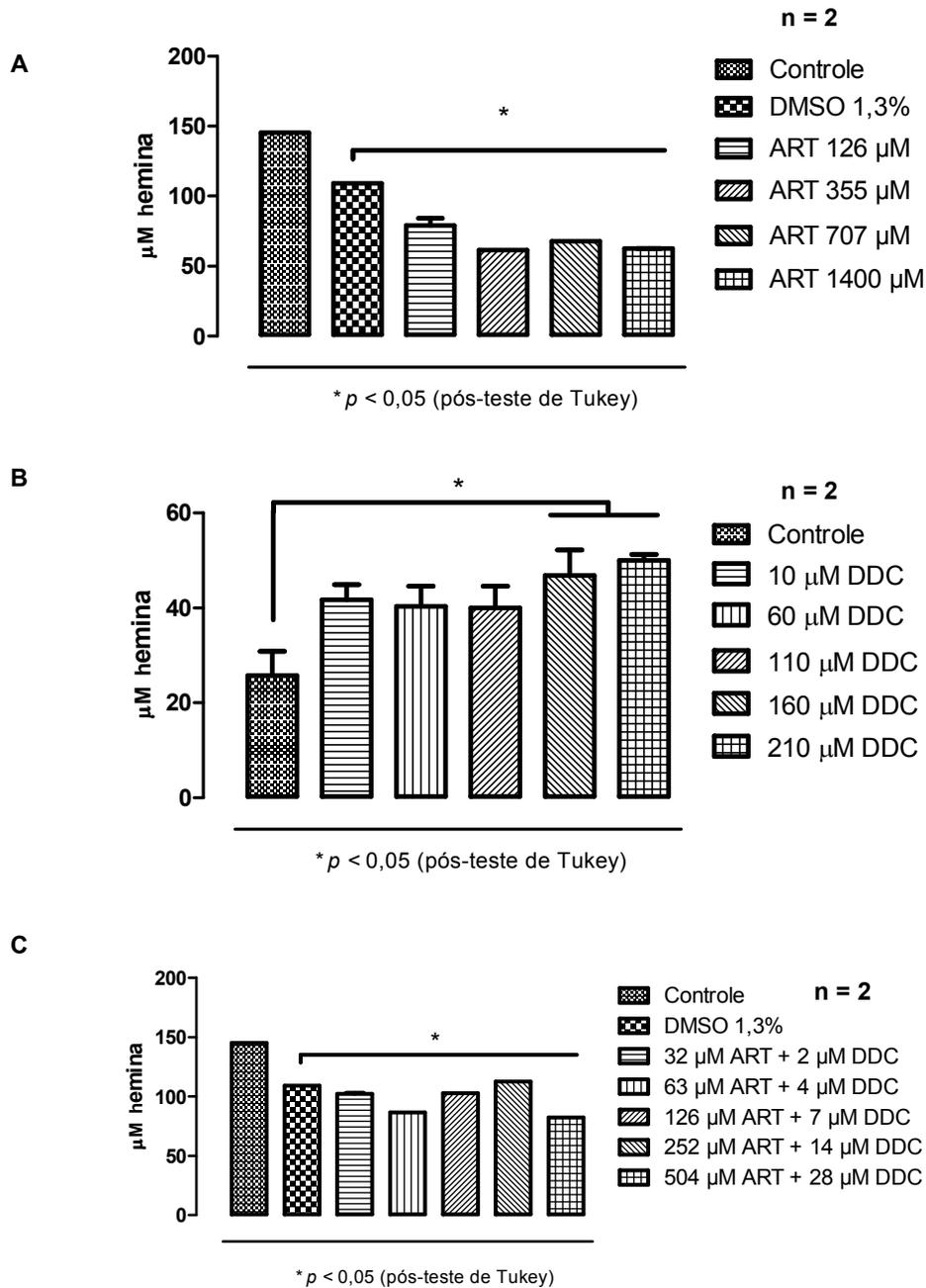


Figura 18: Quantificação de β -hematina, tratada com ART, DDC (A e B) e a combinação ART – DDC (C), respectivamente.

4.7 – Dosagem de peroxidação lipídica

Observa-se que a combinação dos fármacos tem efeito pró-oxidante significativamente superior as drogas isoladas, mesmo empregando concentrações inferiores (Figura 19).

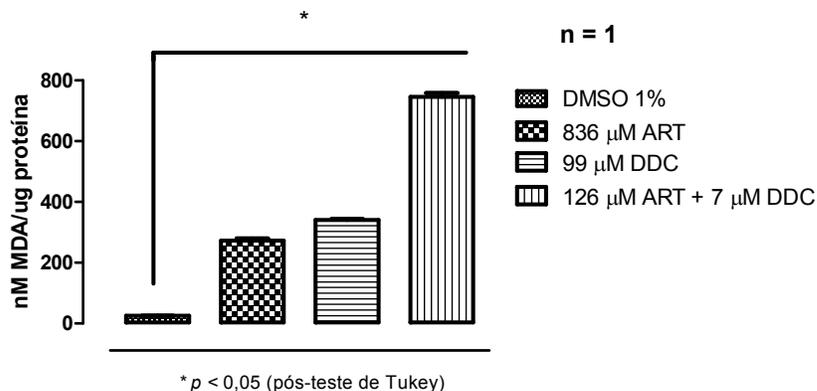


Figura 19: Quantificação de TBARS em vermes machos tratados com as drogas isoladas e combinadas.

4.8 – Quantificação de tióis totais

Nos tratamentos de vermes machos com o DDC, a ART e estas combinadas, foram verificadas que as drogas isoladas reduzem a quantidade de tióis reativos ao DTNB, mais que quando combinadas (Figura 20).

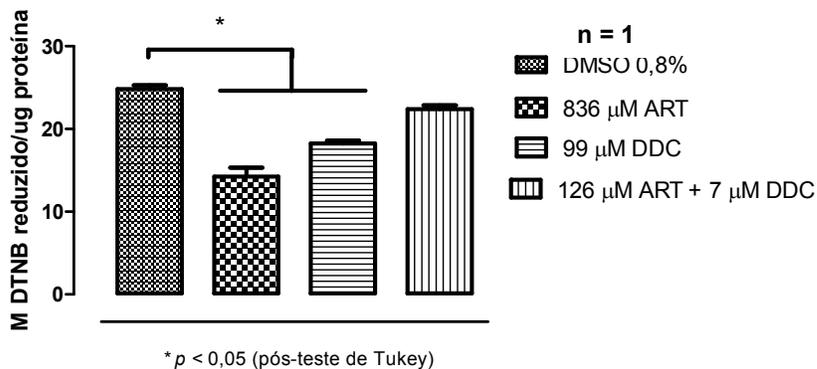


Figura 20: Dosagem de tióis totais em vermes machos tratados com a ART, o DDC e a combinação ART – DDC.

4.9 – Permeabilização celular e tegumentar

O DAPI é um tipo de sonda reativa a ácidos nucléicos, apresentando uma marcação nas amostras quando há permeabilização na membrana. Em todos os ensaios, foi confirmada a morte dos vermes adultos tratados com as drogas isoladas e combinadas, conforme os resultados da análise *in vitro*.

Observa-se que os vermes adultos do grupo controle e do DMSO apresentaram pouca intensidade da marcação. Para as condições tratadas, foi observada uma marcação pelo DAPI mais forte nos machos que nas fêmeas, principalmente na condição da associação ART – DDC (Figuras 21 - 27).

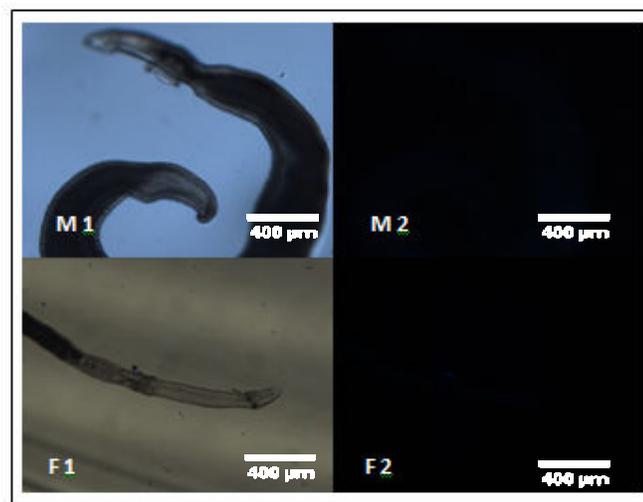


Figura 21: Vermes adultos tratados com DAPI após ensaios *in vitro*, controle negativo. M – Macho e F – Fêmea; 1 – Campo claro com fluorescência e 2 – Fluorescência.

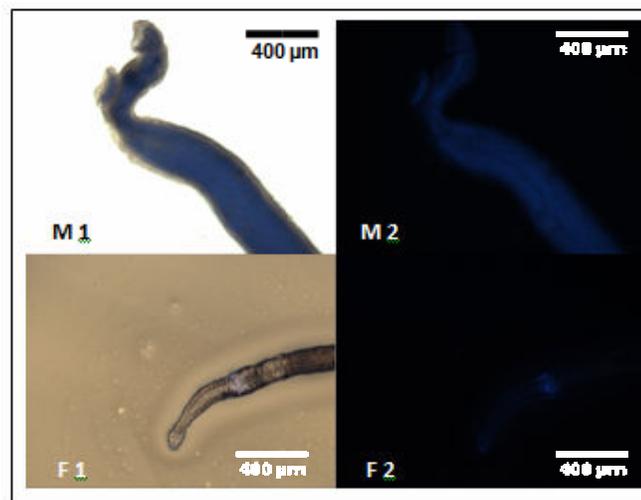


Figura 22: Vermes adultos tratados com DAPI após ensaios *in vitro* com DMSO 1%. M – Macho e F – Fêmea; 1 – Campo claro com fluorescência e 2 – Fluorescência.

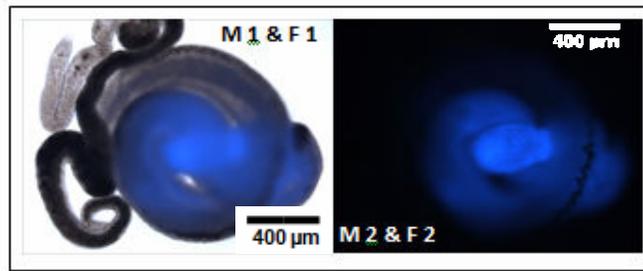


Figura 23: Vermes adultos tratados com DAPI após ensaios *in vitro* com PZQ 5,15 µM. M – Macho e F – Fêmea; 1 – Campo claro com fluorescência e 2 – Fluorescência.

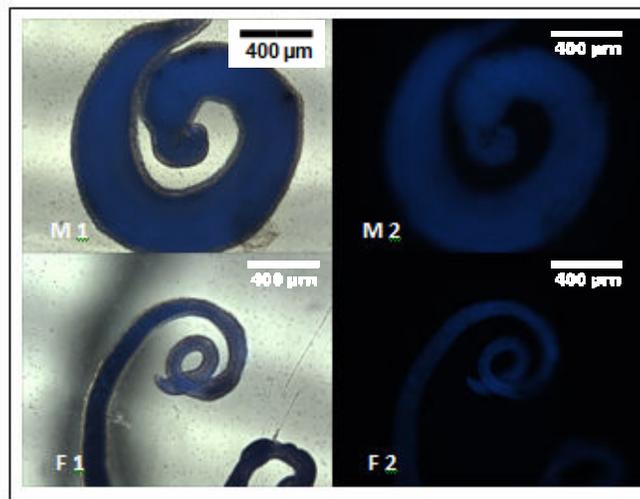


Figura 24: Vermes adultos tratados com DAPI após ensaios *in vitro* com BSO 2 mM. M – Macho e F – Fêmea; 1 – Campo claro com fluorescência e 2 – Fluorescência.

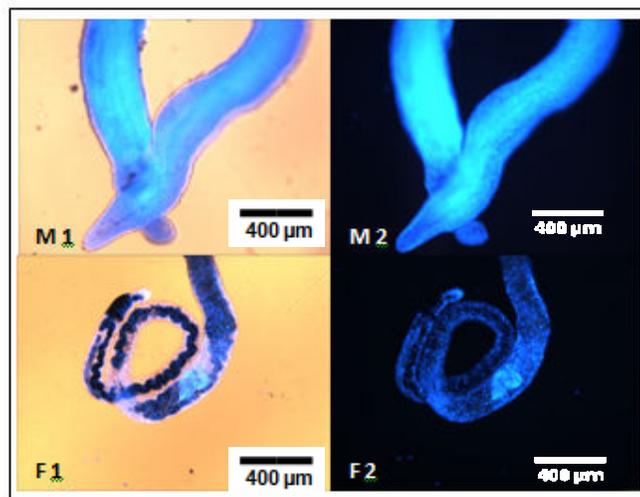


Figura 24: Vermes adultos tratados com DAPI após ensaios *in vitro* com ART 0,7 mM. M – Macho e F – Fêmea; 1 – Campo claro com fluorescência e 2 – Fluorescência.

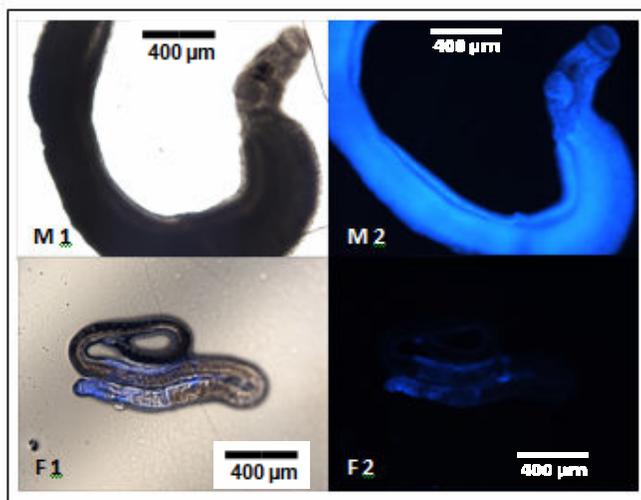


Figura 25: Vermes adultos tratados com DAPI após ensaios *in vitro* com ART 0,11 mM. M – Macho e F – Fêmea; 1 – Campo claro com fluorescência e 2 – Fluorescência.

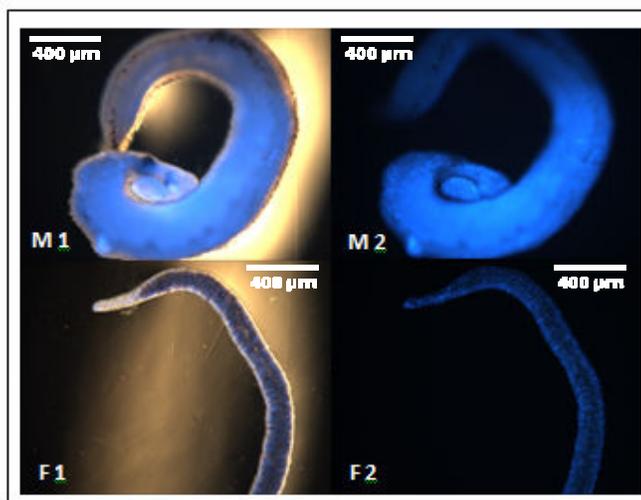


Figura 26: Vermes adultos tratados com DAPI após ensaios *in vitro* com ART 126 μM + BSO 250 μM. M – Macho e F – Fêmea; 1 – Campo claro com fluorescência e 2 – Fluorescência.

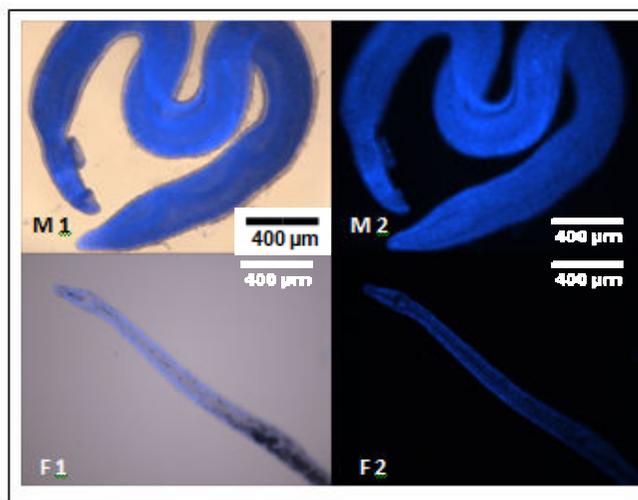


Figura 27: Vermes adultos tratados com DAPI após ensaios *in vitro* com ART 126 μM + DDC 7 μM . M – Macho e F – Fêmea; 1 – Campo claro com fluorescência e 2 – Fluorescência.

4.10 – Detecção de espécies reativas

A carboxi- H_2DFCDA é utilizada para revelar espécies reativas, que reage com estas através de uma reação de oxidação (SILVEIRA, 2004). De acordo com as imagens abaixo, foi possível perceber que as drogas isoladas e combinadas, mesmo com baixas concentrações, foram observadas uma alta reatividade a sonda nos vermes adultos (Figuras 28 - 32).

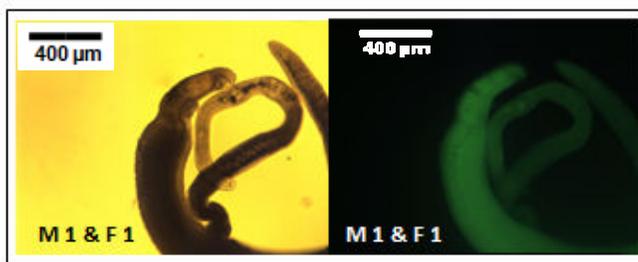


Figura 28: Vermes adultos tratados com carboxi- H_2DFCDA após ensaios *in vitro*, controle negativo. M – Macho e F – Fêmea; 1 – Campo claro e 2 – Campo escuro.

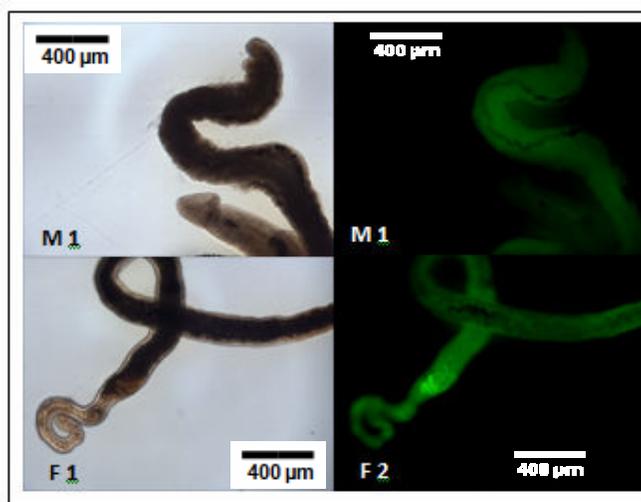


Figura 29: Vermes adultos tratados com caboxi-H₂DFCDA após ensaios *in vitro* com DMSO 1%. M – Macho e F – Fêmea; 1 – Campo claro e 2 – Campo escuro.

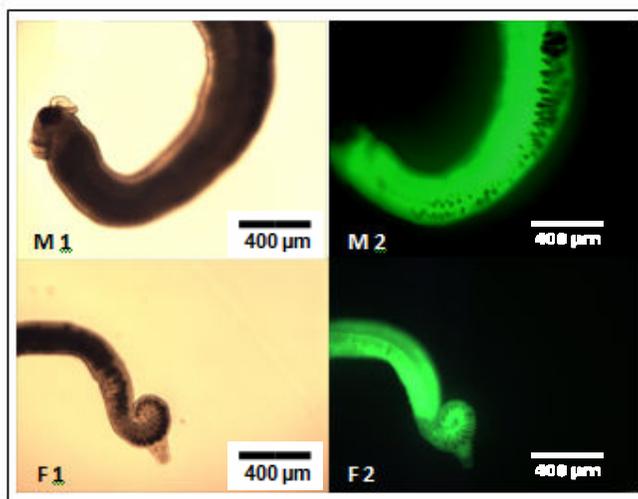


Figura 30: Vermes adultos tratados com caboxi-H₂DFCDA após ensaios *in vitro* com ART 126 μM. M – Macho e F – Fêmea; 1 – Campo claro e 2 – Campo escuro.

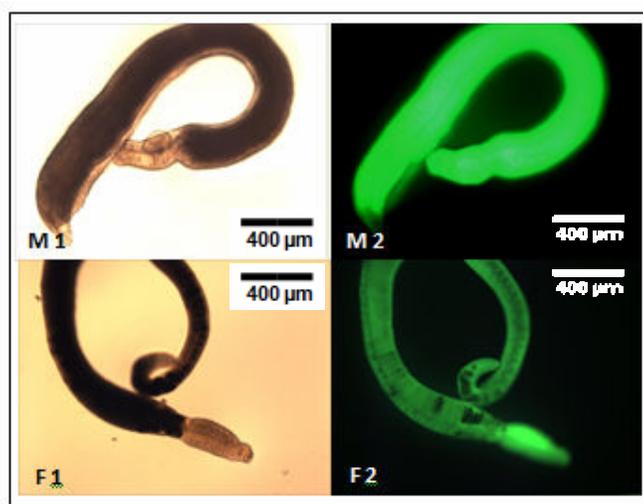


Figura 31: Vermes adultos tratados com caboxi-H₂DFCDA após ensaios *in vitro* com DDC 69 µM. M – Macho e F – Fêmea; 1 – Campo claro e 2 – Campo escuro.

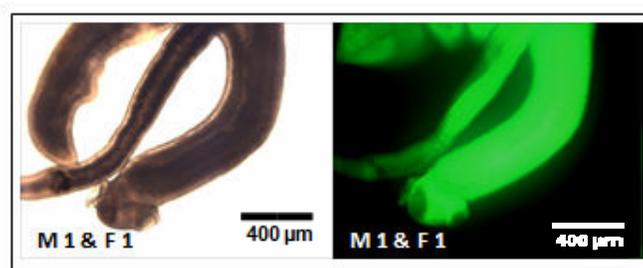


Figura 32: Vermes adultos tratados com caboxi-H₂DFCDA após ensaios *in vitro* com ART 126 µM + DDC 7 µM. M – Macho e F – Fêmea; 1 – Campo claro e 2 – Campo escuro.

4.11 – Microscopia eletrônica de varredura

A MEV foi utilizada para observação de alterações na topografia geral do parasito quando tratado com as drogas isoladas e associadas. Foram confirmados danos nos vermes adultos, como descamação do tegumento em fêmeas e vesiculação nos machos. Estas alterações foram visíveis, quando os vermes foram tratados com as drogas associadas, comparando com as mesmas concentrações destas isoladas (Figura 23, 24, 25, 26 e 27).

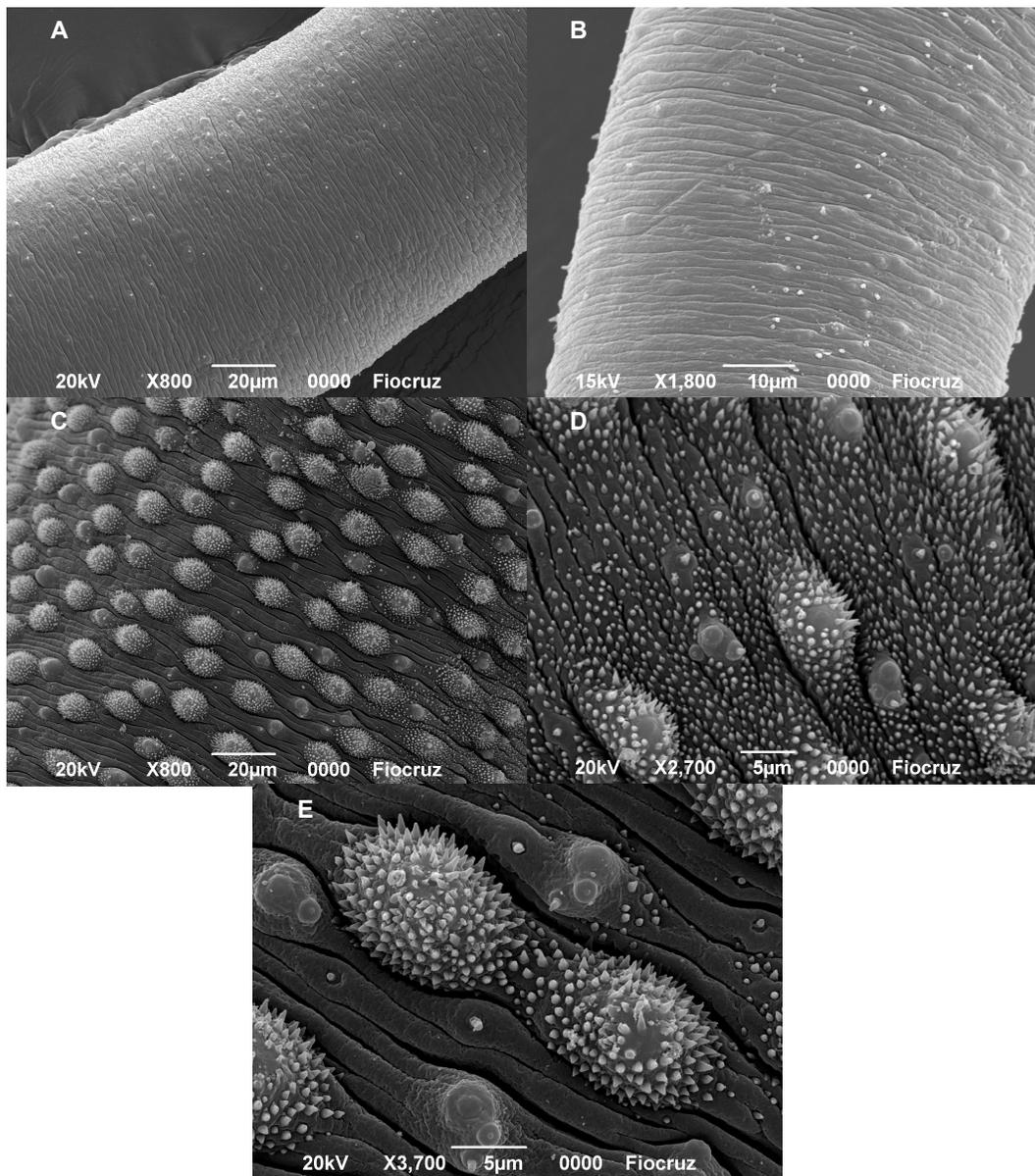


Figura 33: Micrografias eletrônicas de varredura de fêmeas (A e B) e machos (C, D e E) do grupo controle.

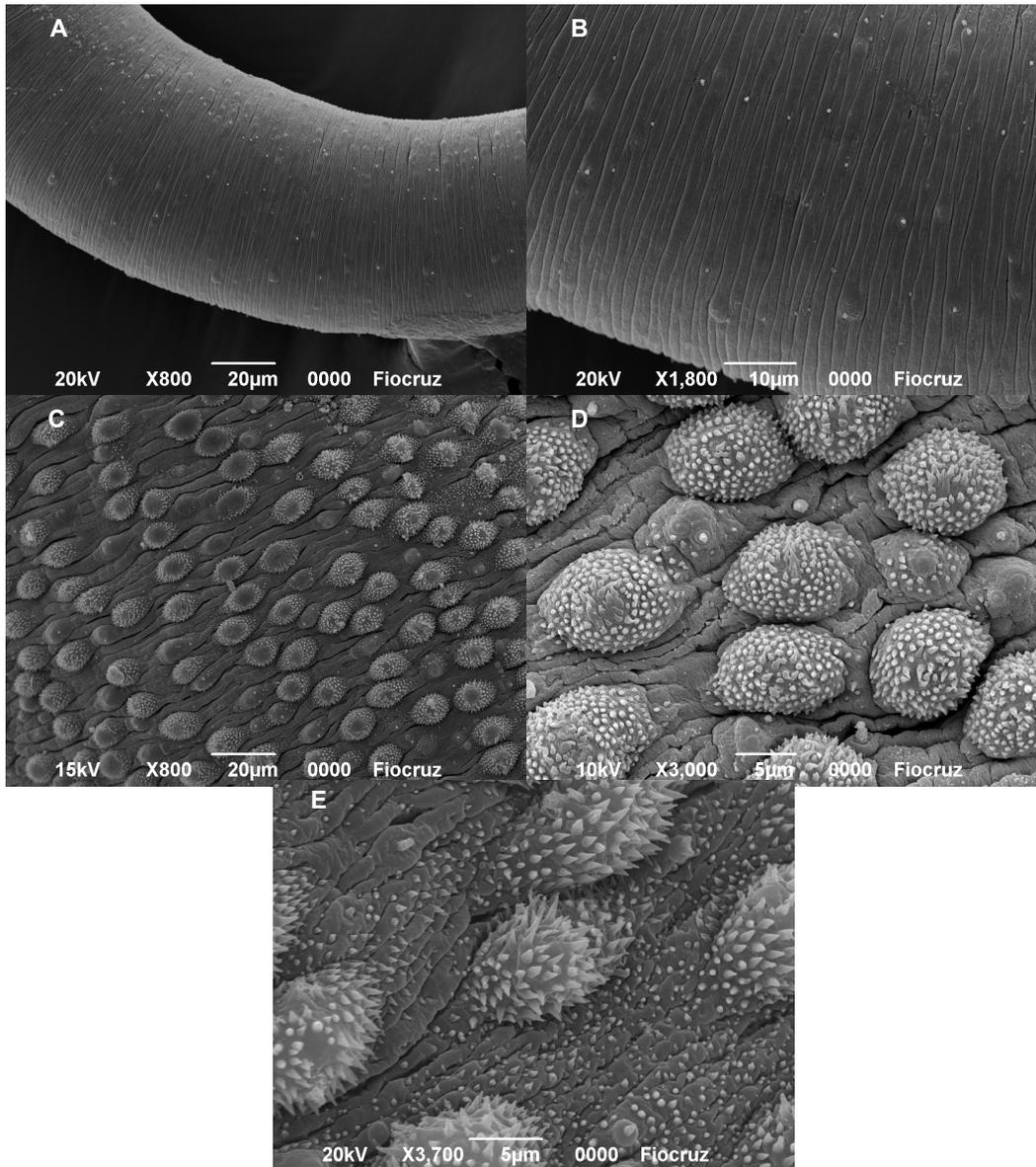


Figura 34: Micrografias eletrônicas de varredura de fêmeas (A e B) e machos (C, D e E) do grupo DMSO 1%.

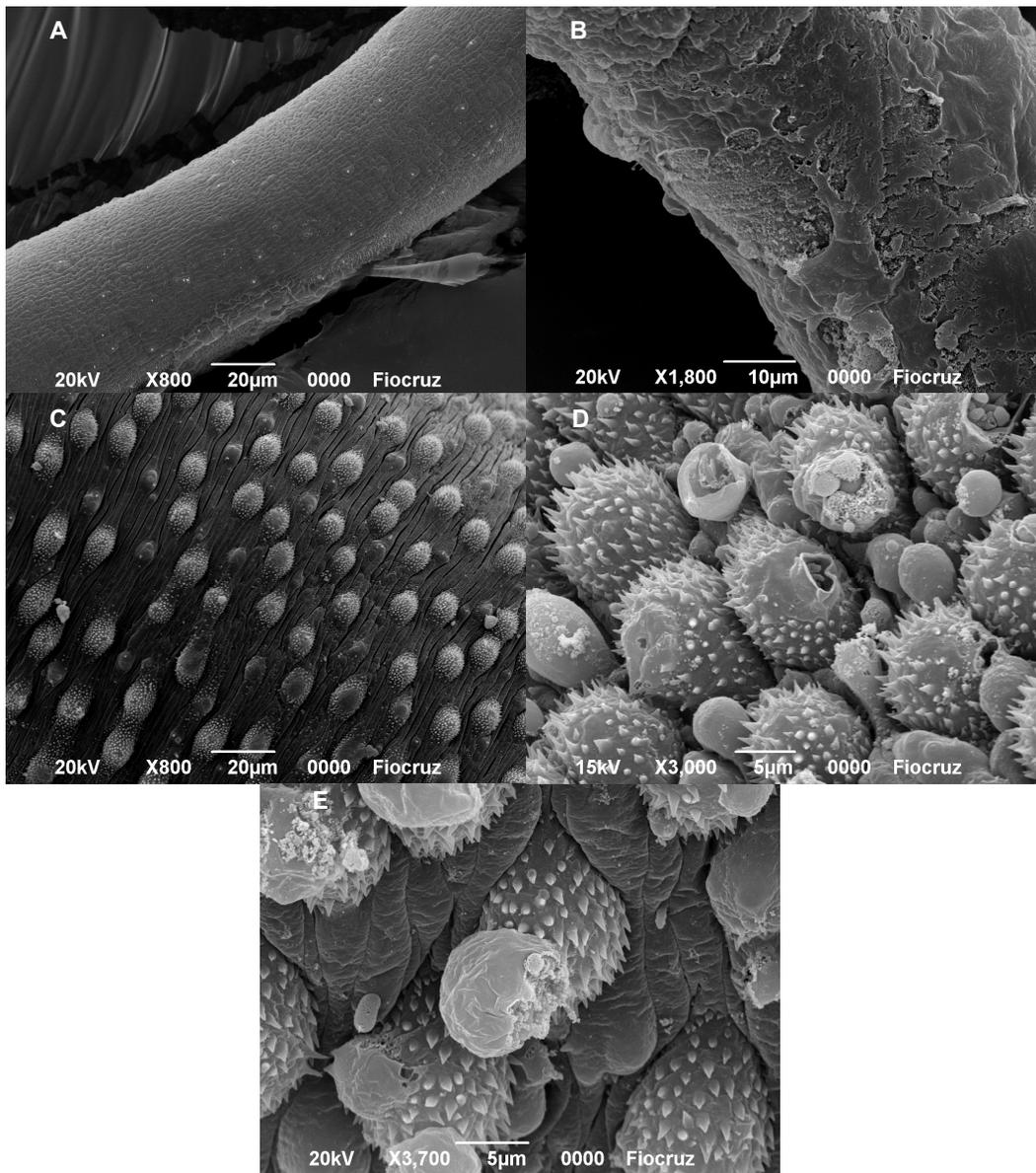


Figura 35: Micrografias eletrônicas de varredura de fêmeas (A e B) tratadas com ART 126 µM e 1,4 mM, respectivamente. Imagens de machos (C) tratados com ART 126 µM e nas figuras (D e E), tratados com ART 1,4 mM.

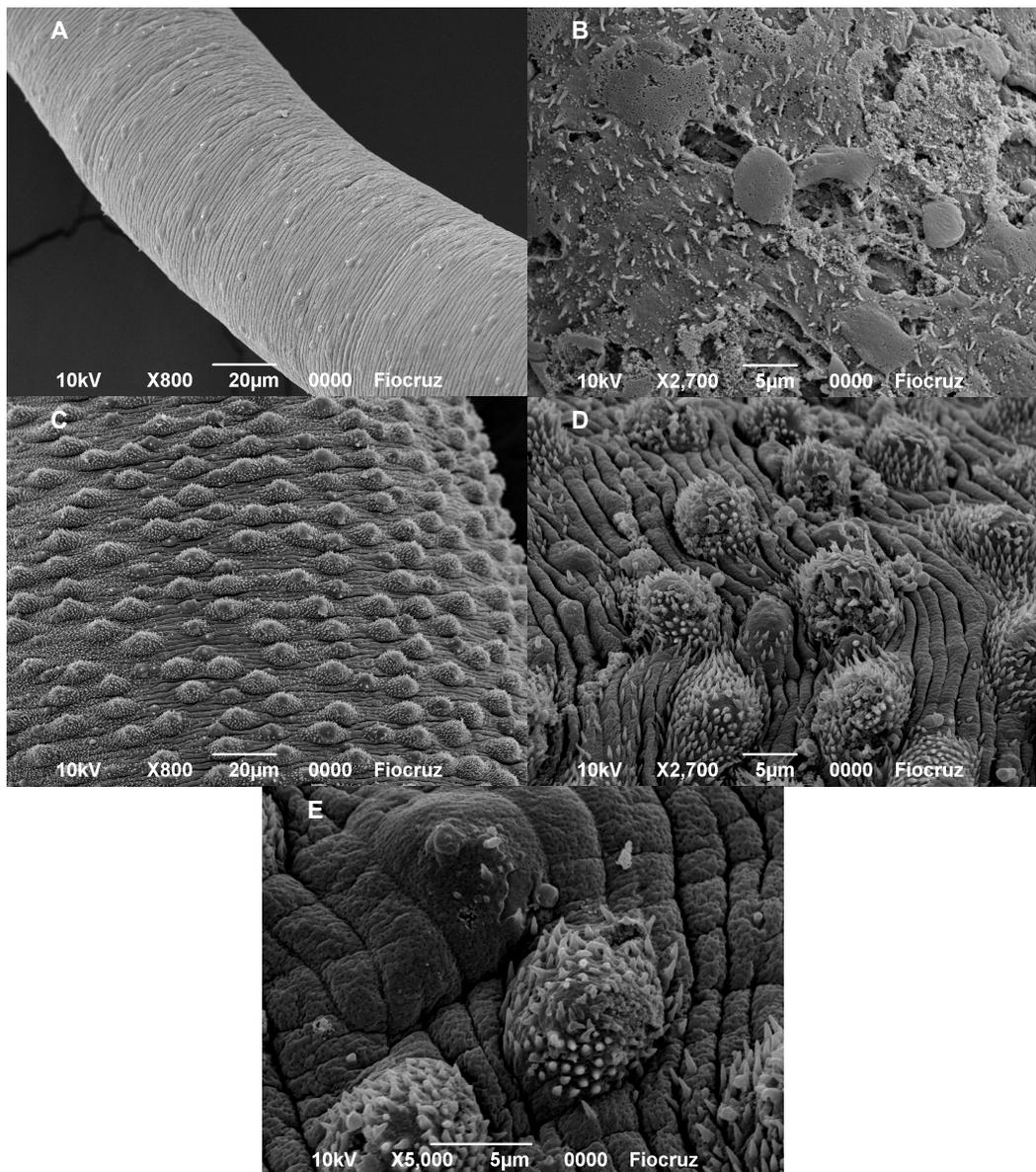


Figura 36: Micrografias de varredura de fêmeas (A e B) tratadas com DDC 6,9 µM e 220 µM, respectivamente. Imagens de machos (C) tratados com DDC 6,9 µM e nas figuras (D e E), tratados com DDC 220 µM.

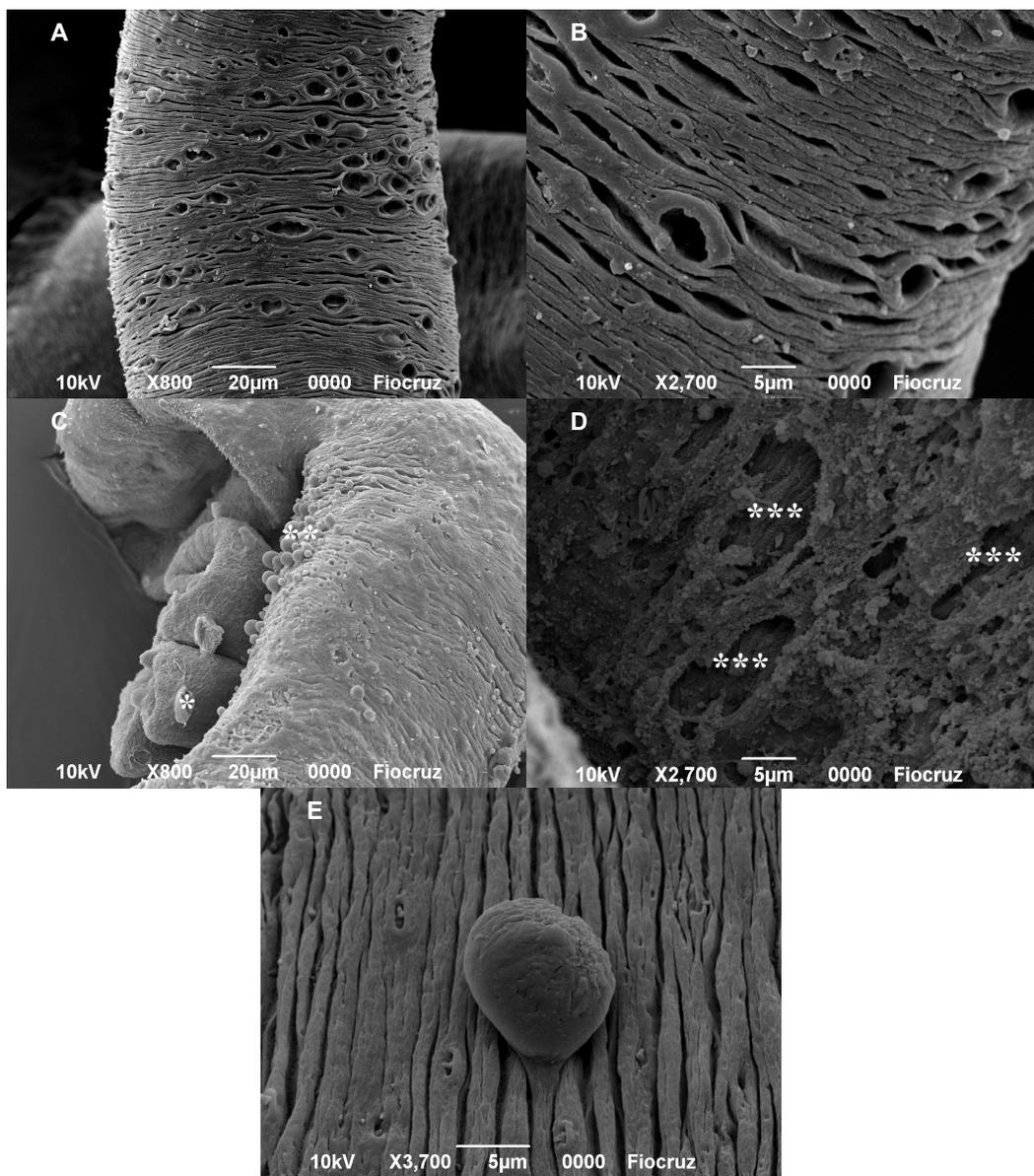


Figura 37: Micrografias de varredura de fêmeas (A e B) tratadas com ART 126 μM + DDC 6,9 μM . Imagens de machos (C, D e E) tratados com ART 126 μM + DDC 6,9 μM . Na figura C, detalhe de danos no tegumento do acetábulo (*) e dilatações próximas a ventosa oral (**); na figura D detalhe de rupturas do tegumento (***) no canal ginecóforo e em E, detalhe de uma dilatação do tegumento também do canal ginecóforo.

5. DISCUSSÃO

A terapêutica eficaz para a esquistossomose mansônica vem se tornando um grande desafio para a comunidade científica. As opções de tratamento são limitadas e de alto custo. Diante deste contexto este projeto surgiu com o intuito de realizar experimentos com novas drogas, testando-as isoladas e combinadas.

A estratégia quimioterápica utilizada neste trabalho abrange o uso da artemisinina, do dietilditiocarbamato de sódio e da butionina sulfiximina. Com resultados obtidos dos ensaios *in vitro* destas drogas, foi possível já perceber que a BSO apresentava uma ED₅₀ elevada e citotóxica. Isto pode ter ocorrido devido à inibição da γ -glutamilcisteína sintetase não ter sido significativa, como não foi observado na literatura (GRIFFTH & MEISTER, 1979), ou seja, havia ainda grandes quantidades de glutathione que poderiam ainda exercer um papel antioxidante contra um possível estresse oxidativo, visto que Mei & LoVerde (1997) demonstraram uma alta expressão da glutathione S-transferase em vermes adultos. Assim foi direcionado o trabalho para a combinação com a ART, objetivando aumentar o efeito da BSO sobre os vermes com concentrações mais baixas.

Os resultados da combinação foram satisfatórios só quando houve aumento nas concentrações da ART, desta forma, esta associação não foi utilizada para os experimentos subsequentes.

Não foi utilizada a combinação DDC + BSO, pois estas poderiam estar atuando de maneira aditiva sobre o verme, ou seja, segundo Griffth & Meister (1979) e Lushchak et al. (2005) ambas interferem no sistema enzimático antioxidante.

Os resultados apresentados pela curva de sobrevivência dos vermes tratados com o DDC evidenciam que esta substância tem um efeito considerável, pois a ED₅₀ foi de 69 μ M nos vermes e em macrófagos, segundo Anjos (2008) a IC₅₀ foi de 217 μ M.

A ART apresentou uma ED₅₀ de 582 μ M, observando que nos testes de toxicidade em esplenócitos foi verificado que esta droga não apresentava diferença significativa quando comparada ao grupo DMSO 1%. As curvas de sobrevivência com a ART foram realizadas tomando como base a concentração de aproximadamente 354 μ M, pois esta foi a ED₅₀ em *Echinostoma caproni* (KEISER et

al., 2006), visto que não foram encontrados trabalhos com a ART em nenhuma espécie do gênero *Schistosoma*.

Dentre as condições da associação no *screening*, foi utilizada a de ART 126 μM + DDC 7 μM para maioria dos experimentos, pois em dois ensaios realizados foi confirmada que esta promovia uma letalidade de aproximadamente 72% nos vermes e não apresentou citotoxicidade. Com este resultado, foram realizados dois experimentos com base nesta condição, para calcular as FIC e assim, verificar se esta combinação apresentava um perfil sinérgico, o que foi confirmado.

A condição da combinação utilizada para o cálculo das FIC não apresentou citotoxicidade, quando comparada ao grupo DMSO 1%, só apresentando toxicidade de 42% em esplenócitos, quando foi utilizada uma concentração três vezes maior. Portanto, a concentração da associação ART 252 μM + DDC 14 μM não foi utilizada para os outros experimentos por estar próxima a condição com uma citotoxicidade equivalente a 42%.

Para os experimentos da análise da atividade das superóxido dismutases dos vermes tratados com o DDC e a ART isoladas e combinadas, em concentrações elevadas, foi possível verificar que o DDC inibiu a atividade destas enzimas e a combinação ART – DDC induziu a um aumento da atividade. Segundo Heikkila, Cabat e Cohen (1976) e Lushchak et al. (2005), a inibição pode ter ocorrido devido à ação quelante do DDC sobre o metal Cu^{2+} para as isoformas citossólica e subtegumentar e sobre o Mn^{2+} da isoforma mitocondrial, além também de poder quelar fatores de transcrição como NF κ -B, assim podendo inibir a expressão deste grupo de enzimas. Já para a ART não foi observada inibição da atividade das superóxido dismutases.

O aumento da atividade destas metaloenzimas, após o tratamento com a associação ART – DDC pode ter ocorrido devido à produção de radicais livres com a inibição da formação da hemozoína, através da quelação do DDC sobre o Fe^{3+} dos grupos hemes, visto que já foi demonstrado por Barney et al. (2004) a inibição da quercetina 2,3 dioxigenase contendo ferro pelo DDC. Já a ART pode promover esta inibição se ligando ao anel porfirínico, por intermédio do seu grupo endoperóxido e impedindo assim, que o grupo propionato se ligue ao Fe^{3+} (Figura 28), primeiro passo necessário para formação da hemozoína (LOUP et al., 2007; SELMECZI et al., 2004).

A inibição da formação de hemozoina foi mais visível com a combinação das drogas que estas isoladas, promovendo o aumento de radicais livres, inclusive íons superóxidos, assim aumentando a atividade das superóxido dismutases.

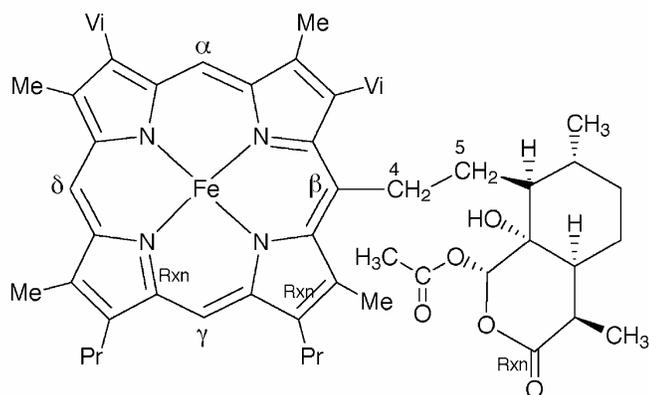


Figura 28: Ligação da artemisinina com o anel porfirínico (SELMECZI et al., 2004).

Para os ensaios realizados com a β -hematina, só foi perceptível a destruição deste composto com o uso do DDC, após o tratamento com todas as drogas isoladas e associadas. Este resultado pode ser justificado pela ação quelante do DDC sobre o Fe^{3+} , podendo este metal interagir com o íon superóxido e água, produzindo radicais hidroxil (Figura 29) (BARNEY et al., 2004; RYTER & TYRREL, 2000) e assim, desintegrando a β -hematina.

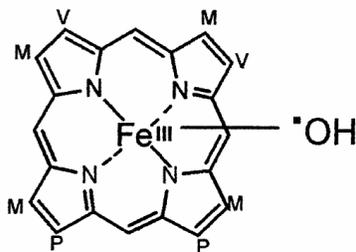


Figura 29: Reação de formação do radical hidroxil e este ligado ao grupo heme (Ryter & Tyrrel, 1999).

A quantificação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico resultou em um aumento destas, em todas as condições de tratamento dos vermes com as drogas isoladas e combinadas, apesar de ser um experimento piloto. Porém este resultado corrobora com os outros, pois foram observados que com a associação há uma maior letalidade dos vermes, inibição da formação de hemozoína, maior produção de ROS e aumento da atividade das superóxido dismutases, assim conseqüentemente, maior peroxidação lipídica.

De acordo Corrêa Soares et al. (2007) gotículas lipídicas extracelulares promovem a formação de hemozoína em condições ácidas, porém com o aumento da peroxidação lipídica, como visto nos resultados, há a possibilidade de diminuição da cristalização deste polímero.

Foram observadas reduções de tióis reativos ao DTNB em todas as condições de tratamento. A diminuição pode ter ocorrido devido à formação de pontes dissulfeto destes grupos com os do DDC (ENEANYA et al., 1981) ou possivelmente pela oxidação dos grupos tióis, promovida pela artemisinina (SMITH et al., 2001).

Os experimentos realizados com as sondas (DAPI e caboxi-H₂DFCDA) confirmaram a produção de radicais livres e permeabilização de membranas com o tratamento das drogas isoladas e associadas. Com estes radicais livres possivelmente há peroxidações lipídicas mediada pela inibição da cristalização de hemozoína, como já demonstrado por Schmitt et al. (1993) e Berman & Adams (2003) e assim permeabilizando membranas (TANKE et al., 1982 *apud* VAN DER LINDEN & DEELDER, 1984). Além destes mecanismos, Aft & Mueller (1983) relataram a degradação de DNA por intermédio da destruição do grupo heme, assim pode ter ocorrido oxidação de ácidos nucléicos, resultando numa maior fluorescência vista nas amostras tratadas, principalmente na associação ART-DDC, resultado confirmado com o uso do DAPI.

Nas imagens de MEV dos vermes tratados com a associação ART – DDC foi observada uma maior freqüência de danos no tegumento em diferentes regiões, como nas ventosas e no canal ginecóforo, além da ocorrência de *blebs* nestas regiões. Segundo Schmitt et al. (1993) e Berman & Adams (2003), a inibição da cristalização de hemozoína promove peroxidações lipídicas, portanto, este fenômeno pode estar ocorrendo no sentido intestino-tegumento e culminando em danos observados nos tubérculos dos machos e descamação do tegumento nas

fêmeas. Além disto, podem ocorrer oxidações de proteínas, como demonstrado por Aft & Mueller (1984) e assim, pode estar ocorrendo as rupturas dos tubérculos iniciada com a destruição dos espinhos que, segundo Cohen et al. (1982) tem constituição basicamente protéica.

Segundo Asawamahasakda e colaboradores (1994), o grupo endoperóxido é capaz de alquilar proteínas, portanto, este pode ser outro mecanismo que promova a destruição dos tubérculos, como visto nas micrografias eletrônicas de varredura dos vermes tratados com a associação ART-DDC e com estas isoladas em concentrações elevadas.

6. CONCLUSÃO

Os resultados indicam que as drogas isoladas atuam em vias distintas no parasito e a associação ART – DDC apresenta realmente um perfil sinérgico. Além disto, a associação não apresentou citotoxicidade de pelo menos 50% em esplenócitos com uma concentração três vezes maior que a condição de melhor atividade no *screening*. Para o teste com a BSO e BSO - ART, não foram observadas atividades esquistossomicidas significativas.

O DDC inibiu totalmente as superóxido dismutases enquanto que a associação com a ART promoveu um aumento da atividade deste grupo de enzimas.

Os vermes tratados com a ART e DDC em altas concentrações apresentaram danos no tegumento, porém quando combinadas, mostraram danos com maior diversidade e frequência, podendo estar associados ao aumento da peroxidação lipídica.

Todos os resultados corroboram com a hipótese de que o mecanismo chave para o efeito da combinação ART – DDC está intimamente ligado à inibição da cristalização da hemozoína.

Diante deste contexto, tornam-se viáveis estudos destas drogas isoladas e combinadas *in vivo*, podendo ser uma nova opção quimioterápica contra a esquistossomose mansônica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFT, R. L.; MUELLER G. C. Hemin-mediated DNA strand scission. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 12069–12072, 1983.

AFT, R. L.; MUELLER, G. C. 1984 Hemin-mediated oxidative degradation of proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 301–305, 1984.

ANGELI, V. et al. Role of the parasitederived prostaglandin D2 in the inhibition of epidermal Langerhans cell migration during schistosomiasis infection. **J Exp Med**, v.193, p.1135 – 1147, 2001.

AMARAL, R. S. An analysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, p. 79-85, 2006.

ANDRADE, Z. A.; BINA, J. C. A patologia da forma hepato-esplenica da esquistossomose mansoni em sua forma avançada (estudo de 232 necropsias completas). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 78, p. 285-305, 1983.

ANJOS, K. G. S. **Efeitos do Dietilditiocarbamato em Trofozoítos de Giardia lamblia: Uma Nova Ferramenta na Terapia contra a Giardíase**. 2008. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) — Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz – Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA, 2008.

ASAWAMAHASAKDA, W. et al. Reaction of Antimalarial Endoperoxides with Specific Parasite Proteins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 38, p. 1854-1858, 1994.

BAMBIRRA, E. A. et al. The tumoral form of schistosomiasis: report of a case with cerebellar involvement. **The Am. J. Trop. Med. Hyg.**, [S. I.], v. 33, p. 76–79, 1986.

BARNEY, B. M. et al. Evidence for a new metal in a known active site: purification and characterization of an iron-containing quercetin 2,3-dioxygenase from *Bacillus subtilis*. **Protein Expression and Purification**, v. 35, p. 131–141, 2004.

BARBOSA et al. Quantitative aspects of the migration and evolutive asynchronism of *Schistosoma mansoni* in mice. **Rev Inst Med Trop. Sao Paulo**, São Paulo v. 20, p. 121-132, 1978.

BERGQUIST, N.R. Schistosomiasis vaccine development: approaches and prospects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, p. 221–227, 1995.

BERMAN, P. A.; ADAMS, P. A. Artemisinin enhances heme-catalysed oxidation of lipid membranes. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 22, p. 1283–1288, 1997.

BRADY, T. C. et al. Extracellular superoxide dismutase is upregulated with inducible nitric oxide synthase after NF-kappa B activation. **Am. J. Physiol.**, [S. I.], v. 273, p. 1002–1006, 1997

CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. *Schistosoma mansoni* & esquistossomose: uma visão multidisciplinar. 1º ed. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008.

CHO, G. et al. The transcriptional repression of the human Cu/Zn superoxide dismutase- (sod1) gene by the anticancer drug, mitomycin C(MMC). **Biochem. Mol. Biol.**, [S. I.], v. 42, p. 949–956, 1997.

COHEN, C. et al. Schistosome Surface Spines Are "Crystals" of Actin. **The journal of cell biology**, v. 95, p. 987-988, 1982.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present . . . and future? **Pharmac. Ther.**, v. 68, p. 35-85, 1995.

CORBISIER, A. P.; HOUBION, A.; REMACLE J. A new technique for highly sensitive detection of superoxide dismutase activity by chemiluminescence. **Anal Biochem.**, [S. I.], v. 164, p. 240-247, 1987.

CORRÊA SOARES, J. B. R. C. et al. Interference with Hemozoin Formation Represents an Important Mechanism of Schistosomicidal Action of Antimalarial Quinoline Methanols. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, p. 1-16, 2009.

CORRÊA SOARES, J. B. R. C. et al. Extracellular lipid droplets promote hemozoin crystallization in the gut of the blood fluke *Schistosoma mansoni*. **FEBS Letters**, v. 581, p. 1742–1750, 2007.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol. Rev.**, [S. I.], v. 82, p. 47–95, 2002.

DOUGALL, W. C.; NICK, H. S. Manganese superoxide dismutase: a hepatic acute phase protein regulated by interleukin-6 and glucocorticoids. **Endocrinology**, [S. I.], v. 129, p. 2376–2384, 1991.

ECKSTEIN-LUDWIG, U. et al. Artemisinins target the SERCA of Plasmodium falciparum. **Nature**, v. 424, p. 957 – 961, 2003.

EL-BASSIOUNI, E. A. Modulation of antioxidant defence in different developmental stages of *Schistosoma mansoni* by praziquantel and arthemeter. **British Journal of Biomedical Science**, v. 64, p. 168 – 173, 2007.

EGAN, T.J.; MAVUSO, W. W.; NCOKAZI K. K. The mechanism of beta-hematin formation in acetate solution. Parallels between hemozoin formation and biomineralization processes. **Biochemistry**, v. 40, p. 204–213, 2001.

EGAN, T. J. Haemozoin formation. **Molecular & Biochemical Parasitology**, 157, p. 127-136, 2008.

ENEANYA, D. L. et al. The actions and metabolic fate of disulfiram. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 21, 575-596, 1981.

FERREIRA, L. A. Forma tumoral encefálica esquistossomótica: apresentação de um caso tratado cirurgicamente. **Revista da Soc. Brasi. de Med. Tropical**, Uberaba, v. 31, p. 89-93, 1998.

FRANK, S. et al. Identification of copper/zinc superoxide dismutase as a nitric oxide-regulated gene in human (HaCaT) keratinocytes: implications for keratinocyte proliferation. **J. Biochem.**, USA, v. 346, p. 719–728, 2000.

GAZZINELLI, A. et al. Socioeconomic determinants of schistosomiasis in a poor rural area in Brazil. **Acta Trop.**, [S. I.], v. 99, p. 260–271, 2006.

GOZA, F. Causes and consequences of migration in the Jequitinhonha Valley of Minas Gerais. **Sociol. Inq.**, [S. I.], v. 62, p. 147–168, 1992.

GRIFFITH, O. W.; MEISTER, A. Potent and Specific Inhibition of Glutathione Synthesis by Buthionine Sulfoximine (S-n-Butyl Homocysteine Sulfoximine). **The Journal of Biological Chemistry**, v. 254, p. 7558-7560, 1979.

HARRIS, C. A. Manganese superoxide dismutase is induced by IFN-gamma in multiple cell types. Synergistic induction by IFN-gamma and tumor necrosis factor or IL-1. **J. Immunol.**, [S. I.], v. 147, p. 149–154, 1991.

HEIKKILA, R. E.; CABBAT, F. S.; COHEN, G. *In vivo* Inhibition of Superoxide Dismutase in Mice by Diethyldithiocarbamate. **The journal of biological chem.**, v. 251, p. 2182-2185, 1976.

HEIKKILA, R. E.; CABBAT, F. S.; COHEN, G. A sensitive assay for superoxide dismutase based on the autoxidation of 6-hydroxydopamine. **J. Biol. Chem.**, USA, v. 251, p. 2182-2185, 1976.

HILL, H. D.; STRAKA, J. G. Protein determination using bicinchoninic acid in the presence of sulfhydryl reagents. **Anal Biochem.**, 170, 203-208, 1998.

HONG, Z. et al. Identification and Purification of a Second Form of Cu/Zn Superoxide Dismutase from *Schistosoma mansoni*. **Infection and immunity**, [S. I.], v. 60, p. 3641-3651, 1992.

HONG, Z. et al. *Schistosoma mansoni*: A Cu/Zn Superoxide Dismutase is Glycosylated When Expressed in Mammalian Cells and Localizes to a Subtegumental Region in Adult Schistosomes. **Experimental Parasitology**, [S. I.], v. 76, p. 101-114, 1993.

HUANG, Y. et al. Transcriptional inhibition of manganese superoxide dismutase (SOD2) gene expression by DNA methylation of the 5_ CpG island. **Free Radic. Biol. Med.**, [S. I.], v. 23, p. 314–320, 1997.

ISOHERRANEN, K. et al. Regulation of copper/zinc and manganese superoxide dismutase by UVB irradiation, oxidative stress and cytokines. **J. Photochem. Photobiol.**, [S. I.], v.40, p. 288–293, 1997.

JACKSON, R. M.; PARISH, G.; HO, Y. S. Effects of hypoxia on expression of superoxide dismutases in cultured ATII cells and lung fibroblasts. **Am. J. Physiol.**, [S. I.], v. 271, p. 955–962, 1996.

KAZURA, J. W. et al. Role of Granulocyte Oxygen Products in Damage of *Schistosoma mansoni* Eggs In Vitro. **The Am. Soc. for Clin. Invest.**, v. 75, p. 1297-1307, 1985.

KEISER, J. et al. Trematocidal Activity of Praziquantel and Artemisinin Derivatives: In Vitro and In Vivo Investigations with Adult *Echinostoma caproni*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, p. 803–805, 2006.

KEPHART, G.M.; ANDRADE, Z.A.; GLEICH, G.J. Localization of eosinophil major basic protein onto eggs of *Schistosoma mansoni* in human pathologic tissue. **American Journal of Pathology**, [S. I.], v. 133, p. 389-396, 1988.

KIM, H. P. et al. Transcriptional activation of the human manganese superoxide dismutase gene mediated by tetradecanoylphorbol acetate. **J. Biol. Chem.**, USA, v. 274, p. 37455–37460, 1999.

LAMBERTUCCI, J. R.; SILVA, L. C. S.; AMARAL, R. S. Guidelines for the diagnosis and treatment of schistosomal myeloradiculopathy. **Rev. da Soc. Bras. de Med. Tropical**, Uberaba, v. 40, p. 574-581, 2007.

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**, [S. I.], v. 76, p. 327-333, 2002.

LOBO, R. Do colo sigmóide na esquistossomose de Manson-Pirajá da Silva. **Publica Medicine**, [S. I.], v. 17, p. 45-48, 1947.

LOUP, C. Trioxaquines and Heme-Artemisinin Adducts Inhibit the In Vitro Formation of Hemozoin Better than Chloroquine. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. 3768–3770, 2007.

LOVERDE, P. T.; CARVALHO-QUEIROZ, C.; COOK, R. Vaccination with Antioxidant Enzymes Confers Protective Immunity against Challenge Infection with *Schistosoma mansoni*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p. 37-43, 2004.

LUSHCHAK, V. et al. Diethyldithiocarbamate inhibits in vivo Cu,Zn-superoxide dismutase and perturbs free radical processes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 1739–1744, 2005.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 265-275, 1951.

MACHADO, P.A. The Brazilian program for schistosomiasis control, 1975–1979. **The Am. J. Trop. Med. Hyg.**, [S. I.], v. 31, p. 76–86, 1982.

MADAN, A.; FAIMAN, M. D. Characterization of Diethyldithiocarbamate Methyl Ester Sulfine as an intermediate in the Bioactivation of Disulfiram. **The Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 272, p. 775-780, 1995.

MARKLUND, S. L. Regulation by cytokines of extracellular superoxide dismutase and other superoxide dismutase isoenzymes in fibroblasts. **J. Biol. Chem.**, USA, v. 267, p. 6696–6701, 1992.

MEIRA, J. A. Esquistossomose mansônica. In: MEIRA, D. A. **Clínica de Doenças Tropicais e infecciosas**. Rio de Janeiro: Editora Interlivros, 1991.

MEI, H.; LoVERDE, P. T. *Schistosoma mansoni*: The developmental Regulation and Immunolocalization of Antioxidant Enzymes. **Experimental Parasitology**, v. 86, p. 69-78, 1997.

MICHALSKI, W. P. Chromatographic and electrophoretic methods for analysis of superoxide dismutases. **J. Chromatogr. B. Biomed. Appl.**, [S. l.] v. 684, p. 59-75, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE/SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica**. 6º ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005, p. 302.

MORAIS, C. N. L. Studies on the Production and Regulation of Interleukin, IL-13, IL-4 and Interferon-g in Human Schistosomiasis Mansoni. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, p. 113-114, 2002.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Meth.**, Palo Alto, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOZA, P.G.; PIERI, O.S.; BARBOSA, C.S.; REY, L. Socio-demographic and behavioural factors related to schistosomiasis in a rural village of sugar-cane zone of Pernambuco, Brazil. **Cad. Saúde Pub.**, Rio de Janeiro, v.14, p. 107-116, 1998.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 10º ed. São Paulo: Atheneu, p. 175-180, 2000.

NEVES, J.; MARTINS, N. R. L. L.; TONELLI, E. Forma toxêmica da esquistossomose mansônica. Considerações diagnósticas em torno de 50 casos identificados em Belo Horizonte. **O Hospital**, Rio de Janeiro, v. 70, p.

NCOZAKI, K. K.; EGAN, T. J. A colorimetric high-throughput b-hematin inhibition screening assay for use in the search for antimalarial compounds. **Analytical Biochemistry**, v. 338, p. 306–319, 2005.

OLIVEIRA, et al. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, [S. l.], v.11, p. 217-221, 2000.

OLIVEIRA, M. F. et al. Structural and morphological characterization of hemozoin produced by *Schistosoma mansoni* and *Rhodnius prolixus*. **FEBS Letters**, [S. l.], v. 579, p. 6010–6016, 2005.

OLSSON, M. E. et al. Localization of enzymes of artemisinin biosynthesis to the apical cells of glandular secretory trichomes of *Artemisia annua* L. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1123–1128, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). FIRST REPORT OF JOINT WHO EXPERT COMMITTEES ON THE PREVENTION AND CONTROL OF SCHISTOSOMIASIS AND SOIL-TRANSMITTED HELMINTHIASIS, 2002. Geneva.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). **Schistosomiasis, countries or areas at risk, 2008**. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_ShistoPrevalence_ITHRiskMap.png>. Acesso em: 25 de nov. 2009.

OTT et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Springer Science and Business Media**, Stockholm, v. 12, p. 913–922, 2007.

OURY, T. D. Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers : a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. **J. Biochem.**, Great Britain, v. 317, p. 51-57, 1996.

PANDEY, A. V. et al. Artemisinin, an Endoperoxide Antimalarial, Disrupts the Hemoglobin Catabolism and Heme Detoxification Systems in Malarial Parasite. **Journal of biol. chem.**, v. 274, p. 19383–19388, 1999.

PEIXINHO, E. L.; ANDRÉ, S. B.; BINA, J. C. Sintomatologia intestinal na fase crônica da esquistossomose mansônica. **Rev Soc Bras Med Trop.**, Uberaba, v. 19, p. 27-30, 1986.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. **Int. J. Parasitol.**, [S. I.], v. 34, p.527-533, 2004.

PITTELLA, J. E. Vascular changes in cerebral schistosomiasis mansoni: a histopathological study of fifteen cases. **The Am. J. Trop. Med. Hyg.**, [S. I.], v. 34, p. 898-902, 1985.

RAMIREZ, B. et al. Schistosomes: challenges in compound screening. **Expert Opin. Drug Discov.**, [S. I.], v. 2, p. 53-61, 2007.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 5º ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

RASO, P.; NEVES, J. Contribuição ao conhecimento do quadro anatômico do fígado na forma toxêmica da esquistossomose mansônica através de punções biópsias. **Annais da Faculdade de Medicina da UFMG**, Minas Gerais, v.22, p.147-165, 1965.

RAHMAN, I.; CLERCH, L. B.; MASSARO, D. Rat lung antioxidant enzyme induction by ozone. **Am. J. Physiol.**, [S.I.], v. 260, p. 412–418, 1991.

REY, L. **PARASITOLOGIA**. 2º edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991.

RUTITZKY, L. I.; ROSA, J. R. L.; STADECKER, M. J. Severe CD4 T Cell-Mediated Immunopathology in Murine Schistosomiasis Is Dependent on IL-12p40 and Correlates with High Levels of IL-17. **The Journal of Immunology**, [S. I.], v. 175, p. 175-176, 2005.

RYTER, S. W.; TYRREL, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, p. 289–309, 2000.

SANTOS, G. R.; ALMEIDA, S. V.; LEITE, L. C. C. Schistosomiasis—a century searching for chemotherapeutic drugs. **Parasitol. Res.**, [S. I.], v. 99, p. 505–521, 2006.

SAYED, A. A. et al. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nature medicine**, v.14, p. 407 – 412, 2008.

SCHMITT, T. H. et al. Hemin-Induced Lipid Membrane Disorder and Increased Permeability: A molecular Model for the Mechanism of Cell Lysis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 307, p. 96-103, 1993.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal Biochem**, v. 25, p.192–205, 1968.

SELMECZI, K. et al. Alkylation of human hemoglobin A0 by the antimalarial drug artemisinin. **FEBS Letters**, v. 556, p. 245-248, 2004.

SILVEIRA, L. R. Considerações Críticas e Metodológicas na Determinação de Espécies Reativas de Oxigênio e Nitrogênio em Células Musculares Durante Contrações. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 48, p. 812-822, 2004.

SMITH, S. L. et al. The role of glutathione in the neurotoxicity of artemisinin derivatives *in vitro*. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, p. 409–416, 2001.

SPIEGELHALDER, C. et al. Purification of Helicobacter pylori Superoxide Dismutase and Cloning and Sequencing of the Gene. **Infection and immunity**, [S. I.], v. 61, p. 5315-5325, 1993.

STRALIN, P.; MARKLUND, S. L. Vasoactive factors and growth factors alter vascular smooth muscle cell EC-SOD expression. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, [S. I.], v. 281, p. 1621–1629. 2001.

TANKE, H. J.; VAN DER LINDEN, P. W. G.; LANGERAK, J. Alternative fluorochromes to ethidium bromide for automated read out of cytotoxicity. **Journal of Immunological Methods**, v. 52, p. 91-96, 1982.

TANNEN, M.B. Migration from the Northeast to the Southeast in Brazil: do migrants succeed? **Rev. Urban Reg. Dev. Stud.**, [S. I.], v. 4, p. 34–49, 1992.

TRAN, M. H. et al. Tetraspanins on the surface of Schistosoma mansoni are protective antigens against schistosomiasis. **Nature medicine**, v. 12, p. 835 – 840, 2006.

TRIANA, B. G. et al. Enzimas que participan como barreras fisiológicas para eliminar los radicales libres: I. Superóxido dismutasas. **Rev. Cubana Invest. Bioméd.**, Habana, v.14, n.1, 1995.

VAN DER LINDEN, P. W. G.; DEELDER, A. M. *Schistosoma mansoni*: A Diamidinophenylindole Probe for *in vitro* Death of Schistosomula. **Exp. Parasit.**, [S. l.], v. 57, p. 125-131, 1984.

VISNER, G. A. et al. Regulation of manganese superoxide dismutase by lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor. **J. Biol. Chem.**, USA, v. 265, p. 2856–2864, 1990.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **J. Biol. Chem.**, USA, v. 244, p. 4406-4412, 1969.

WONG, G. H. W.; GOEDDEL, D. V. Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. **Science**, USA, v. 242, p. 941–944, 1988.

YOO, H. Y.; CHANG, M. S.; RHO, H. M. The activation of the rat copper/zinc superoxide dismutase gene by hydrogen peroxide through the hydrogen peroxide-responsive element and by paraquat and heat shock through the same heat shock element. **J. Biol. Chem.**, USA, v. 274, p. 23887–23892, 1999.

ZHU, C. H. et al. A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase expression. **J. Biol. Chem.**, USA, v. 276, p. 14407–14413, 2001.