

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

“Avaliação genotóxica de líquido de vesícula e extrato salino da forma metacestódea de Taenia solium e de agentes antiparasitários benzimidazólicos”

Luciana Pereira Silva

UBERLÂNDIA - MG

Dezembro - 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

“Avaliação genotóxica de líquido de vesícula e extrato salino da forma metacestódea de Taenia solium e de agentes antiparasitários benzimidazólicos”

Luciana Pereira Silva

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

UBERLÂNDIA - MG

Dezembro – 2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

“Avaliação genotóxica de líquido de vesícula e extrato salino da forma metacestódea de Taenia solium e de agentes antiparasitários benzimidazólicos”

Luciana Pereira Silva

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Orientador

Prof^a Dr^a Julia Maria Costa Cruz

Co-orientadora

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, como parte das exigências para obtenção do título de Doutor em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

UBERLÂNDIA - MG

Dezembro - 2004

FICHA CATALOGRÁFICA

S586a Silva, Luciana Pereira, 1975-
“Avaliação genotóxica de líquido de vesícula e extrato salino da forma metacestódea de *Taenia solium* e de agentes anti-parasitários benzimidazólicos” / Luciana Pereira Silva. - Uberlândia, 2004.
79f. : il.
Orientador: Mário Antônio Spanó.
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.
Inclui bibliografia.
1. Câncer - Teses. 2. Mutagenicidade - Teses. 3. *Drosophila melanogaster* - Teses. 4. *Taenia solium* - Teses. I. Spanó, Mário Antônio. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. III. Título.

CDU: 616-006.6 (043.3)

Hino ao Amor Cristão

“Eu poderia falar todas as línguas que são faladas na terra e até no céu, mas, se não tivesse amor, as minhas palavras seriam como o som de um gongo ou como o barulho de um sino. Poderia ter o dom de anunciar as mensagens de Deus, ter todo o conhecimento, entender todos os segredos e ter tanta fé, que até poderia tirar as montanhas do seu lugar, mas, se não tivesse amor, eu não seria nada.

Poderia dar tudo o que tenho e até mesmo entregar o meu corpo para ser queimado, mas, se não tivesse amor, isso não me adiantaria nada.

Quem ama é paciente e bondoso, não é ciumento, nem orgulhoso, nem vaidoso. Quem ama não é grosseiro nem egoísta, não fica irritado, nem guarda mágoas. Quem ama não fica alegre quando alguém faz uma coisa errada, mas se alegra quando alguém faz o que é certo. Quem ama nunca desiste, porém suporta tudo com fé, esperança e paciência.

O AMOR É ETERNO.

Existem mensagens espirituais, porém elas durarão pouco. Existe o dom de falar em línguas estranhas, mas acabará logo. Existe o conhecimento, mas também terminará. Pois os nossos dons de conhecimento e as nossas mensagens espirituais são imperfeitas. Mas quando vier o que é perfeito, então o que é imperfeito desaparecerá.

Quando eu era criança, falava como criança, sentia como criança e pensava como criança. Agora que sou adulto, parei de agir como criança. O que agora vemos é como uma imagem imperfeita num espelho embaçado, mas depois conhecerei perfeitamente, assim como sou conhecido por DEUS.

Portanto, agora existem estas três coisas: A FÉ, A ESPERANÇA E O

AMOR, porém a maior delas é o AMOR

(Apóstolo Paulo Aos I Coríntios 13)”

Dedicatória

Aos meus avôs, João Batista Pereira e João Horácio da Silva, in memoriam, que não puderam ver a conclusão deste trabalho.

*A **DEUS** por iluminar meu espírito pelo caminho da vida eterna.*

À minha avó, Sebastiana Rezende Pereira, que sempre me amou e está presente em todas minhas realizações.

Ao meu pai, Amélio Horácio da Silva e minha mãe, Maria das Graças Pereira Silva, pelo amor e carinho que sempre me dedicam.

Ao meu sogro, José Rodrigues da Silva e minha sogra, Elieti Sebastião Gonçalves que, mesmo distantes, me deram todo apoio necessário.

Ao meu marido, Regildo Márcio Gonçalves da Silva e meu filho, Oliver Dalton Mauch Silva, pela paciência nos momentos mais críticos e amor para poder continuar esta caminhada.

NUNCA SEREI SUFICIENTEMENTE GRATA:

Ao meu marido **Regildo Márcio Gonçalves da Silva**.

Mantenedor de meu equilíbrio nos momentos de angústia, em que não se confia em si próprio
por se sentir incapaz mediante às perdas comuns que todos nós mortais temos em meio às
circunstâncias da vida.

Por trazer o amor e me fazer sentir segura em seus braços.

Deixo aqui as palavras que nos fizeram ficar juntos:

AMOR, para certas pessoas DEUS dá INTELIGÊNCIA
para outras dá BELEZA,
mas para pessoas muito especiais como você ele concede as DUAS VIRTUDES.

Eu te amo!

Ao meu filho Oliver Dalton Mauch Silva

Dom de Deus é ser mãe.

Você trouxe uma maneira diferente em meu coração de amar.

Você é a realização de meus sonhos!

Amo você meu filho!

AGRADECIMENTOS

Somos uma somatória de tudo que aprendemos de todos aqueles - grandes ou pequenos - que nos ensinam.

Eu sou grata pela inspiração e sabedoria dos homens e mulheres que me acompanharam durante esta caminhada, enviados por DEUS e pelas fontes e raízes de sabedoria transgeracionais que eles me deixaram, ou seja, agradeço a todos professores desde o maternal, até o momento que me proporcionaram minha alfabetização não só de leitura, como de elaborar idéias geradoras de conhecimento, contribuindo para minha formação em nível de Doutora.

Em especial ao amigo e orientador Prof. Dr. Mário Antônio Spanó, pelas diretrizes seguras e permanente incentivo, ensinando com zelo e dedicação a ser uma pesquisadora dentro dos padrões éticos e profissionais; acima de tudo, com respeito ao ser humano.

À Dr^a Julia Maria Costa Cruz que, com carinho, aceitou me orientar desde os primeiros passos na pesquisa científica e, com paciência, soube entender as minhas dificuldades. Além disso, tornou-se um exemplo de integridade, justiça e ética.

Ao Dr. Ulrich Graf, do Instituto de Toxicologia - Universidade de Zürich, Schwerzenbach, Suíça, pelo fornecimento das linhagens de *Drosophila melanogaster* e intercâmbio científico para a realização do Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática.

À Senhora Maria Aparecida Vilela, funcionária da Universidade Federal de Uberlândia, pela paciência, auxílio e colaboração, na realização da metodologia.

Aos membros da Banca examinadora: Prof^a Dr^a Julia Maria Costa Cruz, do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia; Dr^a Sandra Morelli do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia; Prof^a Dr^a Francisca Luz Dias e Prof^a Dr^a Lusânia Maria Gregg Antunes, da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro em Uberaba, MG, pela ampliação em clareza e coerência deste trabalho.

Aos secretários do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, João Martins Neto e Lucileide Freitas Queiroz Damásio, pela competência e auxílio em todos os momentos.

À todos que direta ou indiretamente ajudaram-me na realização deste trabalho.

Obrigada.

APOIO FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (Uberlândia-MG) e recebeu apoio financeiro das seguintes Entidades e Instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)
- Universidade Federal de Uberlândia (UFU)

RESUMO

A neurocisticercose (NCC) é a doença parasitária mais comum do sistema nervoso central (SNC) causada pela forma metacestódea de *Taenia solium*, a qual é prevalente em países em desenvolvimento e re-emergente em sociedades desenvolvidas. Esta parasitose tem sido associada com tumores cerebrais e câncer hematológico em humanos. O possível mecanismo de carcinogênese inclui: indução da imunossupressão pelo parasito; transferência do material genético entre parasito e hospedeiro; inflamação crônica; transformação de células pelos fatores secretados pela metacestódea de *T. solium* e produção de óxido nítrico e outras espécies reativas do oxigênio, com potencial genotóxico, causando danos no DNA, como aberrações cromossômicas. Além disso, os agentes benzimidazólicos utilizados no tratamento da NCC e de outras doenças parasitárias afetam a mitose, o número de cromossomos, a função do fuso e as estruturas dos microtúbulos. Os objetivos deste estudo foram avaliar a atividade genotóxica do líquido de vesícula (LV) e extrato salino (ES) da forma metacestódea de *T. solium* e de agentes benzimidazólicos [albendazol (ABZ), cambendazol (CBZ), mebendazol (MBZ) e tiabendazol (TBZ)] em asas de *Drosophila melanogaster* por meio do teste de mutação e recombinação somáticas (SMART). Larvas de terceiro estágio provenientes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB), foram tratadas, por aproximadamente 48 horas, com diferentes concentrações (12,5; 25,0 e 50,0 µg/mL) do LV e ES da forma metacestódea de *T. solium*; e (50; 75 e 100%) de ABZ, CBZ, MBZ e TBZ. Foram incluídos controles negativo (PBS e água destilada) e positivo (uretano 10 mM). Os resultados obtidos mostram que LV e ES foram genotóxicos em ambos cruzamentos do teste SMART, enquanto que nenhuma diferença estatisticamente significativa foi verificada nas frequências de manchas induzidas pelos agentes benzimidazólicos, quando comparado com o controle negativo. Os experimentos sugerem que, nestas condições experimentais, o LV e ES da forma metacestódea de *T. solium* são genotóxicos, mas que os compostos ABZ, CBZ, MBZ e TBZ não são genotóxicos em células somáticas de *D. melanogaster*.

Palavra chave: *Taenia solium*; SMART; *Drosophila melanogaster*; Antiparasitário.

ABSTRACT

Neurocysticercosis (NCC) is the most common parasitic disease of the central nervous system (CNS) caused by cysticerci of the helminth *Taenia solium*, which is prevalent in developing countries and re-emerging in affluent societies. This helminth has been associated with brain tumours and haematological malignancies in humans. The possible mechanisms leading to carcinogenesis include: parasite-induced immunosuppression; transfer of genetic material between parasite and host; chronic inflammation; cell transformation by factors secreted by *T. solium* metacestode and production of nitric oxide and other species reactive of oxygen with genotoxic potential causing either DNA damage as chromosome aberrations. In addition, the benzimidazoles agents using in the treatment of NCC and others parasitic diseases affect mitosis, chromosome number, spindle function and microtubule structure. The aim of this study was to analyze the genotoxicity of a saline extract (SE) and vesicular fluid (VF) of *T. solium* metacestodes and benzimidazoles agents [albendazole (ABZ), cambendazole (CBZ), mebendazole (MBZ) and tiabendazole (TBZ)] in the *Drosophila melanogaster* wing somatic mutation and recombination test (SMART). Third-instar larvae derived from standard (ST) and high bioactivation (HB) crosses were treated for approximately 48 hours with different concentrations (12.5; 25.0 and 50.0 µg/mL) of SE and VF of *T. solium* metacestode and (50; 75 and 100%) of ABZ, CBZ, MBZ and TBZ. The results obtained shown that the VF and SE were genotoxic in both crosses and that no statistically significant differences in spot frequencies between controls and treated series of the benzimidazoles agents were observed. The experiments suggest that, under these experimental conditions, the VF and SE of *T. solium* metacestode is genotoxic, but the compounds ABZ, CBZ, MBZ and TBZ is not genotoxic in somatic cells of *D. melanogaster*.

Key words: *Taenia solium*; SMART; *Drosophila melanogaster*; Antiparasitic

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância dos parasitos na carcinogênese

Em 1919, Johanes Fibiger descreveu a indução de câncer de estômago em camundongos alimentados com baratas infectadas com larvas de *Spiroptera neoplastica*. A hipótese de Fibiger foi questionada porque outros pesquisadores falharam em reproduzir os seus resultados. Johanes Fibiger recebeu o prêmio Nobel, em 1926, pelo trabalho de carcinoma gástrico induzido por *S. neoplastica* (HERRERA; OSTROSKY-WEGMAN, 2001).

Os carcinógenos biológicos têm sido considerados como uma das principais causas de cânceres humanos (PARKIN et al., 1999). Estimativas indicam que 13% dos cânceres são devido a infecções crônicas causadas por vírus, bactérias e parasitos, sendo que vários parasitos podem estar relacionados com o desenvolvimento de câncer humano, como *Paragonimus westermani* e rhabdomiosarcoma cerebral primário (HAYASHI et al., 1986), *Plasmodium* sp e linfoma de Burkitt (FACER; PLAYFAIR, 1989), *Opisthorchis viverrini* e *Clonorchis sinensis* e colangiocarcinoma (HASWELL-ELKINS; SATARUG; ELKINS, 1992), *Toxoplasma gondii* e meningioma (RYAN et al., 1993), *Schistosoma haematobium* e câncer de bexiga (WARREN et al., 1995), *Schistosoma mansoni* e *Schistosoma japonicum* e carcinoma de cólon (ROSENTHAL; PURTILO, 1996).

A carcinogênese é um processo complexo, no qual células normais crescem e são modificadas, como resultado da interação de múltiplos fatores, incluindo xenobióticos e constituintes endógenos. As helmintíases humanas podem causar instabilidade genética e afetar a comunicação inter- e intracelular, prosseguindo ao desenvolvimento de um tumor, através da inflamação crônica, modulação do sistema imune e secreção de fatores solúveis

(RNA, proteína, carboidratos e lipídios) que interagem com as células do hospedeiro (TROSKO; RUCH, 1998; LOEB; LOEB, 2000; HERRERA; OSTROSKY-WEGMAN, 2001).

A resposta inflamatória crônica local, freqüentemente observada em helmintíases, tem sido postulada como sendo o mecanismo responsável pelo processo de carcinogênese por parasitos (OHSHIMA; BARTSCH, 1994). O mecanismo proposto inclui a produção de NO_2^- e HO^- por leucócitos, em inflamações crônicas (ROSIN et al., 1994). Outro possível mecanismo sugerido é de que enzimas capazes de metabolizar xenobióticos poderiam estar envolvidas no processo neoplásico (GENTILE; DERUITER, 1981).

1.2 Cisticercose humana

A teníase é uma parasitose intestinal provocada pela presença da forma adulta de *Taenia solium* (Linnaeus, 1758) ou *Taenia saginata* (Goeze, 1782) no intestino delgado do homem. A cisticercose humana é o resultado da presença de formas larvárias de *T. solium* (metacestódeo ou cisticerco), conhecido como *Cysticercus cellulosae*, parasitando tecidos humanos. Estes parasitos pertencem ao Filo Platyhelminthes, Classe Cestoda, Ordem Cyclophyllidae e Família Taeniidae (REY, 2001).

O ciclo biológico desses parasitos apresenta dois hospedeiros, um definitivo e um intermediário, e uma fase de vida livre. O único hospedeiro definitivo de *T. solium* e *T. saginata* na fase adulta é o homem. Os hospedeiros intermediários de *T. solium* são suínos e os de *T. saginata* são os bovinos. Há, portanto, três fases com relação à população e parasitos: adulto no hospedeiro definitivo, ovos no ambiente e forma metacestódea no hospedeiro intermediário (PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000).

A Organização Panamericana de Saúde e a Organização Mundial de Saúde (OPAS/OMS, 1994) consideram os índices de 1% para teníase humana, 0,1% para cisticercose humana e 5% para cisticercose animal como endêmicos, confirmando o complexo teníase/cisticercose como problema de saúde pública na América Latina.

Na América Latina, calcula-se que a taxa de prevalência de neurocisticercose (NCC) é de 100 casos por 100.000 habitantes, atingindo cerca de 350.000 pessoas. A NCC é endêmica na América do Sul, no México, América Central, Papua Nova Guiné, Ásia (China, Índia e Indonésia), África do Sul e na Europa oriental (Polônia e Romênia). Esta neuroparasitose é ausente em Israel e alguns países do norte da África, no leste do Mediterrâneo e na Ásia central, locais onde não se consome carne suína, por motivos religiosos (ANTONIUK, 1999; PFUETZENREITER; ÁVILA-PIRES, 2000).

No Brasil, a soroprevalência da cisticercose foi estimada nas diversas regiões geográficas: 8,1% na região Sudeste, 5,8% no Nordeste, 5,3% no Centro-Oeste e 3,5% no Sul do país (VIANNA et al., 1986). Na cidade de Uberlândia (MG) uma análise de 3.937 ocorrências de laudos de necropsia do período de 1971 a 1993 revelaram uma prevalência de 1,4% de cisticercose humana (COSTA-CRUZ et al., 1995). Em Uberaba (MG) localizada a 100Km de Uberlândia, foi verificado uma prevalência de 2,7% em laudos de necropsia (ANTUNES, LMG. comunicado pessoal).

Na cisticercose humana, o homem torna-se hospedeiro intermediário acidental de *T. solium*. A transmissão ocorre pela ingestão de ovos viáveis do parasito por meio da auto-infecção externa, do próprio indivíduo; auto-infecção interna, pelo refluxo de proglotes grávidas para o estômago, através de movimentos antiperistálticos ou vômitos; e a heteroinfecção, devido à ingestão acidental de ovos do parasito na água ou alimentos (TAKAYANAGUI; LEITE, 2001).

Após a ingestão dos ovos, que são constituídos por um embrião hexacanto, ou oncosfera, provido de três pares de acúleos e embrióforo, este perde os acúleos, aumenta de tamanho e mostra-se como uma esfera cheia, formada por células parenquimatosas envolvidas por seu tegumento. Depois, o centro vacuoliza-se e passa a constituir uma vesícula cheia de líquido, enquanto que, em um ponto da superfície, começa a formar-se uma invaginação, crescendo de dentro para o centro da massa líquida. Essa invaginação é o *receptaculum capitis*, em cujo interior diferencia-se o futuro escólex da tênia, provido de quatro ventosas e dupla coroa de acúleos (REY, 2001).

A forma metacestódea de *T. solium* é uma vesícula arredondada ou ovóide, semi-transparente, permitindo notar-se o *receptaculum capitis* como uma pequena mancha leitosa em seu interior. A vesícula pode atingir 15 mm de comprimento por sete ou oito milímetros de largura e possui forma que varia com a localização. O líquido contido na vesícula apresenta sais e proteínas, bem como derivados protéicos, como ácido úrico, água, uréia e creatina, existindo ainda vestígios de colesterolina e de glicose. O líquido de vesícula apresenta densidade igual a 1,0097 e 1,557% de matéria sólida (por evaporação), das quais 0,3 a 0,5% são compostos nitrogenados. Dos constituintes inorgânicos, os principais são cloretos (0,7%) (FLISSER et al., 1990).

Os metacestódeos são encontrados em diferentes estádios de desenvolvimento nos tecidos do hospedeiro: **a) etapa vesicular** - cisticercos viáveis possuem uma membrana transparente, contendo líquido e a larva invaginada em seu interior; áreas de tegumento do parasito apresentam-se histologicamente intactas, mas outras áreas podem ser vistas com infiltrado inflamatório no hospedeiro e gliose. A resposta imune pode variar da tolerância até intensa resposta inflamatória; **b) etapa vesicular coloidal** – a vesícula aparece mais espessa e com líquido turvo ou fracamente gelatinoso, esbranquiçado e a larva fragilizada. O escólex apresenta sinais de degeneração hialina. No tegumento do parasito observam-se alterações,

tais como infiltrado inflamatório com linfócitos, neutrófilos, monócitos e histiócitos, além de fibroblastos e fibras colágenas. No tecido do hospedeiro, as arteríolas vizinhas ao parasito apresentam endarterite e necrose fibrinóide na túnica média. Eventualmente, encontra-se oclusão completa da luz vascular por proliferação endarterial ou por um trombo; **c) etapa granular-nodular** – a vesícula tende a reduzir seu tamanho, seu conteúdo torna-se semi-sólido e o metacestódeo não está mais viável. O escólex é transformado em um grânulo mineralizado. O infiltrado inflamatório é composto por células mononucleares e restos do parasito são visualizados; **d) etapa nodular calcificada** – consiste em um nódulo sólido mineralizado, circundado totalmente por tecido conjuntivo denso, não modelado. Os constituintes do parasito não são identificados (ESCOBAR-IZQUIERDO, 1988; PITTELLA, 1997; SOTELO; DEL BRUTTO, 2000; LINO JÚNIOR et al., 2002).

As manifestações clínicas da cisticercose estão na dependência do local anatômico onde se encontram os metacestódeos, das características das lesões, da quantidade e fase de desenvolvimento e degeneração do parasito e da intensidade da resposta inflamatória do hospedeiro (DEL BRUTTO, 1999).

Na interação parasito-hospedeiro, o cisticerco revela, por meio de corte histológico, superfície lisa, camada cuticular eosinofílica, e camadas celular, muscular e reticular frouxa no inferior. Quando os parasitos são viáveis, observa-se pequena inflamação com linfócitos, plasmócitos e eosinófilos, caracterizando uma inflamação do tipo celular e crônica. Pode haver áreas de necrose nas mediações, onde os vasos apresentam vascularização, infiltração perivascular de linfócitos, fibrose e proliferação endotelial, com estreitamento ou obliteração da luz dos vasos. A ausência ou inflamação reduzida é resultado da secreção de serina proteases, que inibem a ativação do complemento, a ativação de linfócitos e a produção de citocinas, com destaque para as interleucinas (IL) IL2, IL5 e IL10 (RODRIGUES Jr. et al., 2000).

A NCC é uma doença pleomórfica em que o SNC é afetado pela presença do parasito propriamente dito, pela reação inflamatória, pela fibrose residual, pelo granuloma e pela calcificação. O SNC reage com a formação de um tecido inflamatório, o que causa fenômenos degenerativos nos neurônios circunjacentes, com desmielinização da substância branca, proliferação glial e infiltração de células. A resposta inflamatória torna-se mais evidente quando os parasitos estão em fase de degeneração, onde observam-se linfócitos, alguns neutrófilos e eosinófilos (RESTREBO et al., 2001).

O metacestódeo de *T. solium* mantém mecanismos de evasão da resposta imune do hospedeiro. Alguns dos mecanismos propostos para explicar a prolongada sobrevivência do parasito são: mascaramento da membrana parasitária com absorção de proteínas do hospedeiro; mimetismo molecular, sintetizando essas moléculas; variação da expressão antigênica do parasito nos locais privilegiados do SNC; e indução de supressão ou tolerância imune, sugerindo a investigação da NCC e a oncogênese (DEL BRUTTO et al., 2000).

Análises do comportamento de diferentes antígenos presentes no líquido de vesícula (LV) e no extrato salino (ES) da forma metacestódea de *T. solium*, na detecção de anticorpos específicos, apresentaram sensibilidade e especificidade elevadas em diferentes testes imunológicos, demonstrando que estes antígenos são eficazes no reconhecimento do sistema imune (COSTA, 1986; SHIGUEKAWA et al., 2000; BARCELOS et al., 2001).

A primeira indicação do possível papel da cisticercose na indução de alterações no DNA de células hospedeiras foi reportada por Flisser et al. (1990), que demonstraram alta frequência de alterações cromossômicas em linfócitos de suínos naturalmente infectados com cisticercos de *T. solium*, quando comparados com os linfócitos de animais não infectados.

Estudos desenvolvidos no México demonstraram um aumento na frequência de aberrações cromossômicas em linfócitos de animais e humanos com cisticercose (HERRERA et al., 1999; 2000).

Um estudo, realizado em linfócitos de 10 pacientes com NCC e 10 pacientes controles, demonstrou alta incidência de aberrações nos cromossomos 7, 11 e 14, sugerindo que a exposição permanente ao antígeno pode causar instabilidade cromossômica específica (HERRERA et al., 2001).

Dados de 18 casos de necropsias, realizadas em crianças mexicanas com NCC mostraram que 22% tinham desenvolvido leucemia ou linfoma (RIDAURA, 1987). Um estudo patológico, em 481 casos de NCC necropsiados, permitiu estabelecer associação com neoplasmas malignas em 21% dos casos (VILLAGRÁN; OLVERA, 1988). Um estudo epidemiológico específico reportou uma correlação entre doenças hematológicas malignas e NCC (HERRERA et al., 1999).

Uma alta frequência de mutações no *locus* HPRT, em linfócitos de pacientes com NCC, foi demonstrada por Montero et al. (1994). Após o tratamento com praziquantel a frequência de mutações retornou ao valor espontâneo.

A indução de danos no DNA, em linfócitos humanos tratados com um fator de secreção da forma metacestódea de *T. solium*, foi avaliada pelo teste de micronúcleo (MN) que detecta agentes clastogênicos e agentes aneugênicos, demonstrando uma frequência alta (36 micronúcleos / 1000 células binucleadas), sugerindo que este fator solúvel representa um fator de risco para a instabilidade do DNA em indivíduos infectados (HERRERA et al., 2003).

1.3 Doenças parasitárias e agentes antiparasitários

O desenvolvimento de quimioterápicos específicos está condicionado ao entendimento da fisiologia do parasito. A recíproca é verdadeira, isto é, o entendimento do modo de ação de um quimioterápico pode fornecer informações sobre a fisiologia do parasito (TRACY; WEBSTER Jr, 1996).

Apesar do progresso no desenvolvimento de vacinas, a quimioterapia permanece como o método isolado mais eficaz e econômico de controlar a maioria das parasitoses. Os agentes antiparasitários precisam ser seguros e eficazes aos pacientes, mesmo que o uso terapêutico destes seja complexo e sujeito à variações do hospedeiro, do parasito e dos fatores ambientais (TRACY; WEBSTER Jr, 1996; CHIEFFI; GRYSCHK; AMATO NETO, 2000).

O mecanismo de ação e os efeitos adversos dos agentes antiparasitários tornam-se importantes no planejamento das ações de controle e seu efeito sobre o organismo hospedeiro. Entre os efeitos adversos, os efeitos genotóxicos dos antiparasitários têm chamado a atenção de diversos pesquisadores, devido à associação existente entre efeito genotóxico e a indução de câncer (TRICKER et al., 1991; DOMINGUEZ et al., 1995; ELIZONDO et al., 1996; MONTERO; OSTROSKY-WEGMAN, 1997; QUINTERO et al., 1998; GURRERA, 1999; Le BRAS, 1999; HUDSON, 2000; DELESCLUSE et al., 2001).

Entre os agentes antiparasitários, destacam-se os derivados do benzimidazol. No entanto, alguns pesquisadores (ANTUNES; TAKAHASHI, 1994; PICKERING, 2000) têm demonstrado que vários membros desta classe de compostos possuem potencial mutagênico, teratogênico e atividade citotóxica.

Contraditoriamente, vários estudos demonstraram atividade anticarcinogênica de agentes benzimidazólicos como albendazol (POURGHOLAMI et al., 2001), cambendazol e mebendazol (DELATOUR et al., 1976) e tiabendazol (LANKAS et al., 2001).

1.4 Derivados do Benzimidazol

Os benzimidazólicos (BZ) são agentes antihelmínticos polivalentes, de amplo espectro contra parasitos de importância médica veterinária e humana. Os derivados do benzimidazol, que possuem ações terapêuticas mais eficazes, têm modificações nas posições 2 e/ou 5 no anel benzimidazol (TOWNSEND; WISE, 1990) (**Figura 1**).

Estes compostos provocam muitas alterações bioquímicas nos helmintos, como por exemplo, a inibição da furamato-redutase mitocondrial específica, interagindo com uma quinona endógena; transporte reduzido de glicose e desacoplamento da fosforilação oxidativa (LACEY, 1988).

Os BZ interferem na produção de energia, com conseqüente paralisia muscular e morte do parasito. A ação está baseada no bloqueio do transporte de grânulos secretores e movimentação de organelas subcelulares de helmintos. Estes efeitos coincidem com o desaparecimento dos microtúbulos citoplasmáticos. Albendazol, cambendazol, mebendazol e tiabendazol atuam inibindo a polimerização dos microtúbulos o que pode resultar em aneuploidia e inibir o transporte de glicose, levando à morte celular (MAILHES, MARCHETTI, 1994).

O anel benzimidazólico oferece a possibilidade básica de substituição de até sete diferentes posições. A introdução de um pequeno substituinte na posição 2 e alguns na posição 5 caracterizam os anti-helmínticos BZ (VELÍK et al., 2004).

A ação primária destas drogas é inibir a polimerização dos microtúbulos, ligando-se à β tubulina, afetando o desenvolvimento larval e o transporte de carboidratos (captação de glicose) resultando na depleção de glicogênio dos parasitos e, por sua vez, na formação reduzida de trifosfato de adenosina (ATP), necessário para a sobrevivência e reprodução destes (CHERTER; CABEÇA, 2000). Conseqüentemente, ocorre paralisia e morte gradual dos parasitos (nematódeos e cestódeos), que são eliminados passivamente pelas fezes. Os BZ não interferem no metabolismo da glicose no homem, porque o sistema microtubular das células hospedeiras é diferente daquele dos helmintos (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2001).

Os compostos do grupo dos benzimidazóis são classificados da seguinte maneira:

a) Tiazólicos: tiabendazol, cambendazol.

b) Metilcarbamatos: Parbendazol, mebendazol, flubendazol, albendazol, fembendazol, oxfendazol.

c) Halogenados: triclabendazol.

d) Pró- benzimidazóis: febantel, tiofanato, netobimin.

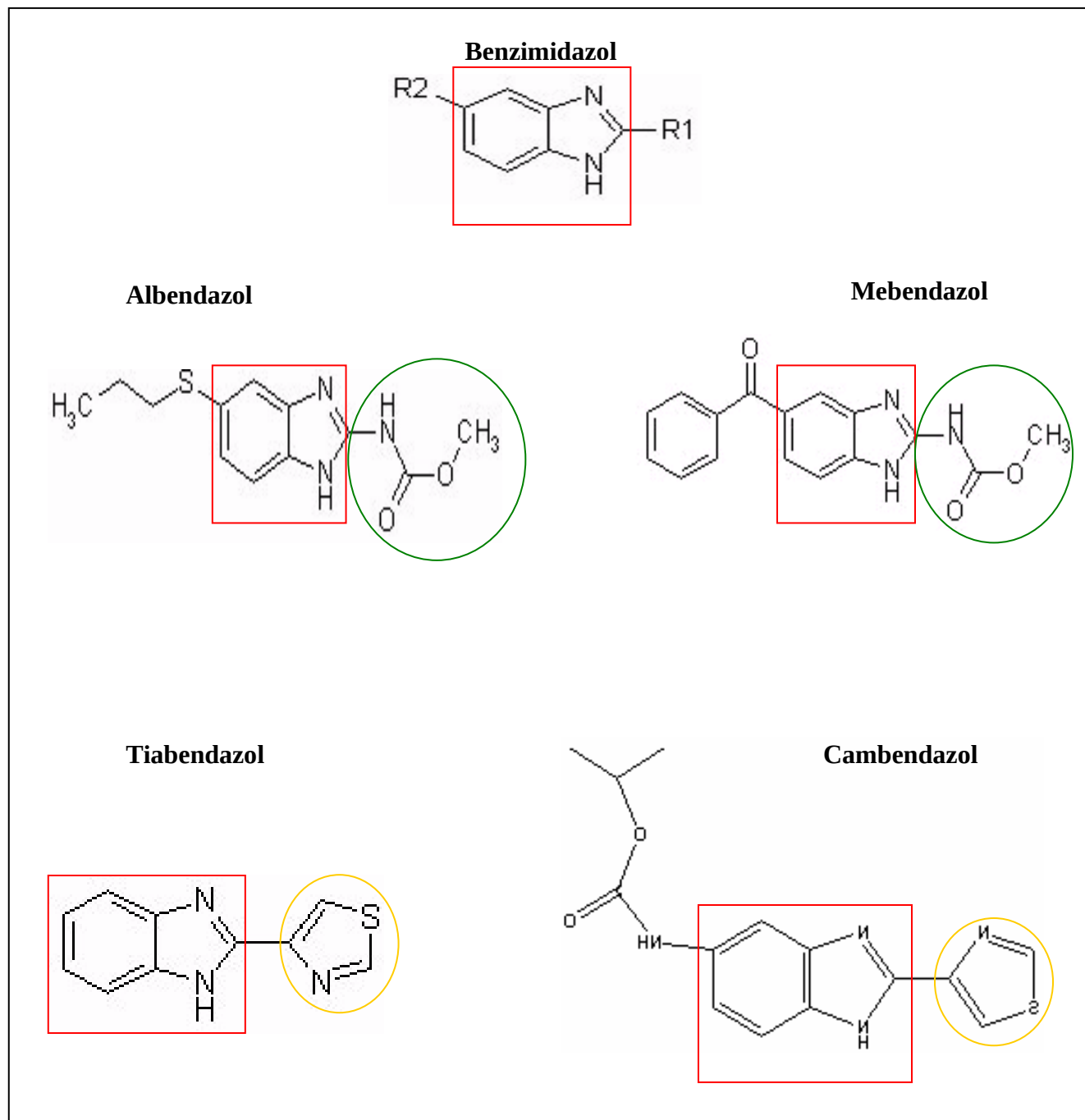


Figura 1. Fórmulas estruturais do benzimidazol e dos derivados albendazol, cambendazol, mebendazol e tiabendazol (VELÍK et al., 2004).

1.4.1 Albendazol

O albendazol (ABZ) [metil-(5-propiltiolbenzimidazol)] é um carbamato de benzimidazol (**Figura 1**). Exerce efeito antiparasitário eficaz no tratamento da ancilostomíase, ascaridíase, cisticercose (mas não recomendado para NCC), enterobíase, estrogiloidíase, teníase, triquinose e tricuriase. Por ser teratogênico e embriotóxico não deve ser usado em gestantes (BINA, 1998; KOROLKOVAS; FRANÇA, 2001).

O ABZ aumenta, de maneira dose-dependente, a concentração de enzimas microsossomais citocromo P450 e a atividade EROD (específico de P4501A), a qual está correlacionada com aumento específico no nível de citocromo P450 em ratos Wistar (ASTEINZA et al., 2000).

Contraditoriamente, Pourgholami et al. (2001) relataram que o ABZ foi capaz de suprimir a proliferação do carcinoma hepatocelular de células *in vitro* e em camundongos BALB/c *in vivo*.

O efeito do ABZ foi avaliado por Baliharová et al. (2003) em citocromo P4501A de hepatócitos de ratos e células HepG2, demonstrando uma indução aumentada na atividade EROD e MROD (específico de P450 2B e 3A) após 72h de tratamento.

1.4.2 Cambendazol

O cambendazol (CBZ) (éster 1 metileílico do ácido [2-(4-tiazolil)-1H-benzimidazol-5-il]carbâmico) (**Figura 1**) é indicado no tratamento da estrogiloidíase. Possui efeito nematicida contra uma variedade de parasitos gastrintestinais em bovinos, carneiros, ovelhas e cavalos (KOROLKOVAS; FRANÇA, 2001).

O CBZ possui propriedades embriotóxicas e antimitóticas, além de induzir aberrações cromossômicas em cavalos (DELATOUR et al., 1976; GOIN; MAYER, 1995).

1.4.3 Mebendazol

O mebendazol (MBZ) (éster metílico do ácido (5-benzoil-1H-benzimidazol-2-il) carbâmico) (**Figura 1**) é um protótipo do carbamato de benzimidazol introduzido no tratamento das infecções por nematódeos (BINA, 1998; KOROLKOVAS; FRANÇA, 2001).

A ação antihelmíntica é altamente eficaz contra ascaridíase, capilariase, enterobíase, trichiuriase, ancilostomíase e estrogiloidíase. A imobilização do parasito e a morte ocorrem lentamente e a sua liberação do trato gastrointestinal pode não se completar até três dias após o tratamento (BENNETT; GUYATT, 2000).

Este fármaco foi testado quanto à clastogenicidade em células da medula óssea de ratos Wistar e clastogenicidade e potencial antimitótico em cultura de linfócitos do sangue periférico humano, sendo que este não induziu aumento na frequência de aberrações cromossômicas, mas foi eficiente em bloquear o ciclo celular em metáfase (ANTUNES; TAKAHASHI, 1994).

A genotoxicidade do MBZ também foi testada em *Aspergillus nidulans*, verificando-se a ocorrência de erro na segregação cromossômica (DELATORRE et al., 1994).

Baliharová et al. (2003) avaliaram o efeito de baixas concentrações do MBZ em citocromo P4501A de hepatócitos de ratos e células HepG2, demonstrando um aumento na indução da atividade EROD e MROD após 72h de tratamento.

1.4.4 Tiabendazol

O Tiabendazol (TBZ) [2-(4'-tiazolil)-1H-benzimidazol] (**Figura 1**) é o fármaco de escolha no tratamento da estrogiloidíase, triquinose, toxocaríase, escabiose, capilaríase, dracunculíase e tricostrongilíase. Possui ação larvicida e ovicida *in vitro*, em concentrações muito baixas, sendo seu mecanismo de ação através da inibição do sistema fumarato-redutase mitocondrial específico de helminto, possivelmente ao interagir com uma quinona endógena (BINA, 1998; KOROLKOVAS; FRANÇA, 2001).

Estudos citogenéticos indicam que o TBZ inibe a formação do fuso celular de *A. nidulans* (ANTOCCIA et al., 1991; CREBELLI et al., 1991). Além disso, o TBZ induz aneuploidia e/ou tetraploidia em diferentes linhagens celulares de hamster Chinês *in vitro*; tetraploidia, células endoreduplicadas e c-mitoses, sem relação dose-efeito, em cultura de linfócitos do sangue periférico humano (NATARAJAN et al., 1993; SBRANA et al., 1993; WARR; PARRY; PARRY, 1993).

Um estudo *in vitro*, com linfócitos humanos, mostrou que o TBZ induz aumento estatisticamente significativo no número de MN, concordando com diferentes estudos *in vivo*. Injeções intraperitoneais de TBZ em camundongos provocaram aumento na incidência de MN em células de medula óssea (VAN HUMMELEN; KIRSCH-VOLDERS, 1992; MARRAZZINI et al., 1994).

Em hepatócitos de coelho, o TBZ aumenta de maneira dose-dependente a concentração de enzimas microssomais citocromo P450 e um aumento na atividade EROD, a qual está correlacionada com um aumento específico no nível de citocromo P4501A1 (AIX et al., 1994; GALTIER et al., 1996).

O TBZ não é teratogênico, ou seletivamente fetotóxico, dependendo do organismo (camundongos, ratos ou coelhos) e da dose administrada (LANKAS et al., 2001).

1.5 Teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de asas de *Drosophila melanogaster*

Os testes regulatórios de Toxicologia Genética constituem-se em uma série de testes de mutagenicidade selecionados para detectar agentes químicos e físicos capazes de induzir mutações. Uma mutação é definida como uma mudança na sequência do DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica. Os agentes que mudam a sequência do DNA são "tóxicos" para o gene e são chamados de "genotóxicos". Uma vez que as mutações são freqüentemente associadas com o desenvolvimento de cânceres e defeitos ao nascimento, o conhecimento do potencial genotóxico de um agente químico industrializado, ou naturalmente presente no ambiente, é uma informação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao estabelecimento de risco para o homem (GRIFFITHS et al., 1998).

O teste para detecção de mutação e recombinação somática ("Somatic Mutation and Recombination Test" – SMART) foi idealizado por Graf et al. (1984), utilizando como biomonitor a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*. Esse sistema apresenta a vantagem de ser um eucarioto de curto período de geração (aproximadamente 10 dias a 25°C), caracteres morfológicos bem definidos e grande número de linhagens mutantes, caracterizadas geneticamente. Além disso, este organismo teste possui um sistema enzimático semelhante ao dos mamíferos, que permite o metabolismo de agentes xenobióticos (BARRS, 1980; VOGEL, 1980; HÄLLSTROM et al., 1984; GRAF et al., 1996).

A **Figura 2** mostra o ciclo vital da *D. melanogaster*. No início do desenvolvimento embrionário da *Drosophila*, grupos de células (discos imaginais) são separados. Essas células proliferam mitoticamente durante o desenvolvimento larval até diferenciarem-se em estruturas do corpo da mosca adulta (olhos, asas, etc). Se ocorrer uma alteração genética em uma destas

células do disco imaginal, haverá a formação de um clone que ao se dividir permitirá que as células descendentes tenham a mesma mutação da célula inicial (GRAF et al., 1996).

No SMART são utilizadas as linhagens de *D. melanogaster* com os marcadores genéticos “multiple wing hairs” (*mwh*); “flare³” (*flr³*) e “Oregon R, flare³” (*ORR; flr³*), que apresentam expressões fenotípicas bem definidas. A linhagem *mwh* (constituição genética *y; mwh jv*) possui o marcador *mwh* mantido na linhagem como uma mutação viável em homozigose recessiva, localizada na extremidade do braço esquerdo do cromossomo 3 (3-3,0) e que tem sua manifestação fenotípica caracterizada por três ou mais tricomas por célula da asa. A linhagem *flr³* apresenta indivíduos com constituição genética *flr³ / ln(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*. O marcador *flr³* é uma mutação recessiva, que também encontra-se no braço esquerdo do cromossomo 3, numa posição mais proximal (3-38,8) e sua manifestação fenotípica é caracterizada por um pêlo modificado em forma de chama. O marcador *flr³* é letal em homozigose zigótica, ou seja, zigotos homozigotos para o *flr³* não conseguem se desenvolver até a fase adulta (GRAF et al., 1984; GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

Devido à letalidade do marcador *flr³*, em homozigose no zigoto, foi desenvolvido um cromossomo balanceador TM3, Bd^S (Third Multiple 3, Beaded-serrate) que mantém a heterozigose da linhagem. A presença deste balanceador, demonstrada pela borda serrilhada da asa, impede que haja recombinação, ou seja, a troca de genes entre cromossomos homólogos, devido à presença de múltiplas inversões neste cromossomo (GRAF et al., 1996).

Os cromossomos 1 e 2, provenientes da linhagem Oregon R, resistente ao DDT (DAPKUS; MERELL, 1977), desenvolvidas por Frölich, Würgler (1989), apresentam alta atividade das enzimas citocromo P-450, as quais são responsáveis pela metabolização e ativação de promutágenos e procarcinógenos. Os marcadores *ORR; flr³* encontrados em indivíduos com constituição genética *ORR; flr³ / ln(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*

são empregados no cruzamento conhecido como Alta Capacidade de Bioativação (“High Bioactivation cross - HB”) (GRAF et al., 1989; GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995)

No teste para detecção de mutação e recombinação em células somáticas de asas de *D. melanogaster* são utilizados dois cruzamentos: 1) cruzamento padrão (ST) no qual machos “mwh” (*mwh* + / *mwh* +) são cruzados com fêmeas virgens das linhagens *flr*³ (+ *flr*³ / *TM3 Bd*^S); 2) cruzamento de alta bioativação metabólica (HB) no qual machos “mwh” (*mwh* + / *mwh* +) são cruzados com fêmeas *ORR; flr*³ (*ORR* / *ORR*; + *flr*³ / *TM3 Bd*^S). Ambos cruzamentos, produzem indivíduos trans-heterozigotos marcados (*mwh* + / + *flr*³) (MH) e indivíduos heterozigotos balanceados (*mwh* + / *TM3 Bd*^S) (BH) (GRAF et al., 1984; 1989).

O teste SMART detecta, em células somáticas, perda da heterozigose decorrente de alterações genéticas em células primordiais dos discos imaginais de asas da larva. A análise dos indivíduos MH permite detectar a ocorrência de mutações de ponto, pequenas aberrações cromossômicas e recombinações mitóticas proximais e distais. A análise dos indivíduos BH também permite detectar a ocorrência de mutações de ponto e pequenas aberrações cromossômicas. No entanto, devido à presença de inversões múltiplas no cromossomo balanceador, as células resultantes de recombinação mitótica são inviáveis. A célula que sofreu a perda do alelo selvagem irá desenvolver o fenótipo mutante durante a metamorfose no estágio de pupa, e pode ser diferenciada facilmente das demais (GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995).

Assim sendo, a utilização de um organismo eucarioto, que ativa enzimaticamente promutágenos e procarcinógenos, faz do SMART um teste eficiente, capaz de detectar não só mutações de ponto, deleções, certos tipos de aberrações cromossômicas, não-disjunção cromossômica, bem como detectar e quantificar a frequência de recombinação mitótica. A conversão gênica e a recombinação mitótica são potentes mecanismos para a perda da

heterozigose em células somáticas, o que pode levar ao desenvolvimento de tumores (GRAF et al., 1984; GUZMÁN-RINCÓN; GRAF, 1995; GRAF et al., 1996).

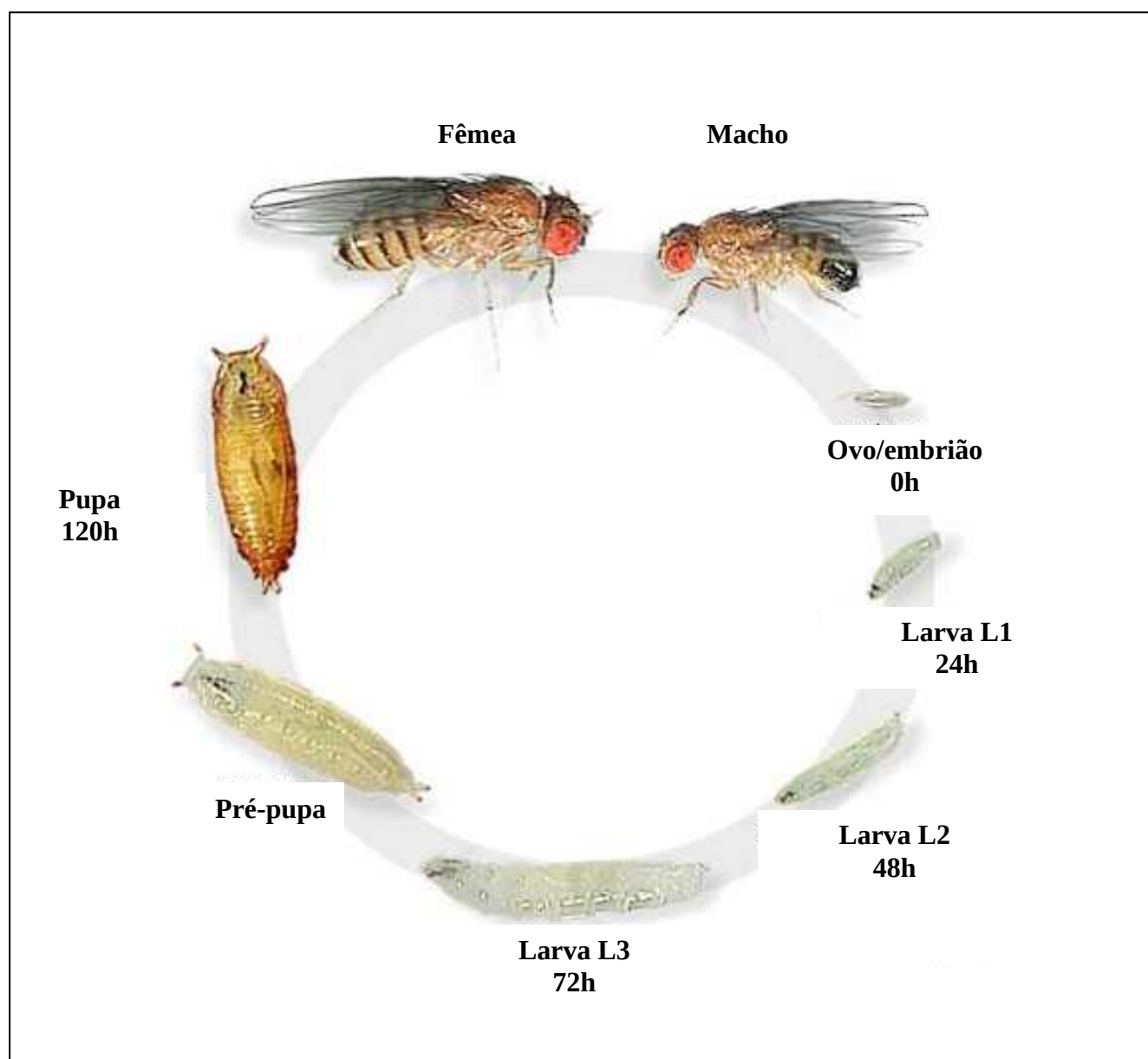


Figura 2. Ciclo de vida de *D. melanogaster*, adaptado de <http://flymove.uni-muenster.de/Homepage.html> (24-11-2004)

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- Avaliar por meio do Teste de Mutação e Recombinação Somática (SMART) em células de asas de *D. melanogaster*, a genotoxicidade dos seguintes compostos:
 - ✓ Líquido de vesícula (LV) e extrato salino (ES) da forma metacestódea de *T. solium*.
 - ✓ Agentes antiparasitários derivados do benzimidazol (albendazol , cambendazol, mebendazol e tiabendazol).
- Verificar se os diferentes radicais, associados ao anel benzimidazólico dos agentes antiparasitários analisados, têm influência na atividade genotóxica dos mesmos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção de metacestódeos de *T. solium*

Os metacestódeos de *T. solium*, provenientes de suínos portadores de infecção natural maciça, foram obtidos de músculos esqueléticos, utilizados no prazo máximo de dois dias, conservados a 4°C. Os parasitos, separados por dissecação, resultaram em cisticercos íntegros e rompidos, que foram submetidos a quatro lavagens em solução salina (NaCl 0,15M), armazenados em frascos, identificados e conservados a -20°C até serem utilizados no preparo dos extratos antigênicos.

3.2 Líquido de vesícula (LV) da forma metacestódea de *T. solium*

Para obtenção do LV, os cisticercos íntegros foram rompidos com lâmina de bisturi e o fluido colhido, centrifugado a 4.800 g por 15 minutos a 4°C. A dosagem protéica do sobrenadante foi realizada pelo método de Lowry et al. (1951).

3.3 Preparo do extrato salino (ES) de metacestódeos de *T. solium*

O ES foi preparado conforme Costa et al. (1982). Cinquenta cisticercos, equivalentes à 0,6g de material biológico, íntegros e rompidos, foram lavados rapidamente em três trocas de solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH 7,2. Após este procedimento, o PBS foi desprezado e os cisticercos foram ressuspensos em 5 mL de água destilada, rompendo-se as larvas mecanicamente, utilizando homogeneizador de tecidos elétrico (Glas-col®, USA), durante 5 minutos em banho de gelo.

Em seguida, os fragmentos foram submetidos ao tratamento por ultra-som (Thornton, Inpec Eletrônica, São Paulo, Brasil) em quatro ciclos de 40 Khz por 30 segundos, em banho de gelo. Após o último ciclo, foi realizada a isotonização da suspensão parasitária com 5 mL de solução salina (NaCl 0,3M) e submetido novamente ao tratamento por ultra-som, três ciclos de 40 Khz por 30 segundos, em banho de gelo.

O material foi deixado por duas horas a 4°C sob agitação lenta e, posteriormente, centrifugado a 10.000 g (Du Pont Sorval®, Products Newtown, Conectcut, USA) por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido constituiu o extrato salino. Após a dosagem protéica (LOWRY et al., 1951) o extrato antigênico foi distribuído em alíquotas de 0,5 mL, identificados e conservados a -20°C.

3.4 Linhagens mutantes de *D. melanogaster*

As linhagens mutantes são provenientes do Instituto de Toxicologia - Universidade de Zürich, Schwerzenbach, Suíça e mantidos no Laboratório de Mutagênese do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Foram utilizadas fêmeas virgens das linhagens mutantes *flr*³ (constituição genética *flr*³ / *ln(3LR)TM3*, *ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*) e *ORR*; *flr*³ (constituição genética *ORR/ORR*; *flr*³ / *ln(3LR)TM3*, *ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S*) e machos da linhagem *mwh* (*mwh* + / *mwh* +).

3.5 Controle positivo (Agente genotóxico)

Como controle positivo foi utilizado o uretano (etil carbamato) 10mM, CAS N° 51-79-6 (Fluka AG, Buchs, Switzerland), dissolvido em água destilada estéril.

3.6 Preparação dos agentes antiparasitários

Os quatro agentes BZ [ABZ (CAS 54965-21-8), CBZ (CAS 26097-80-3), MBZ (CAS 31431-39-7) e TBZ (CAS 148-79-8)] foram utilizados na forma de suspensão e diluídos, imediatamente antes do uso, em água destilada estéril e as concentrações padronizadas em 50, 75 e 100%, respectivamente.

3.7 Teste para detecção de mutação e recombinação somática em células de asas de *D. melanogaster* (GRAF et al., 1989; GRAF; VAN SCHAIK, 1992)

As linhagens mutantes descritas no item 3.4 foram mantidas em frascos de ¼ de litro contendo meio de cultura para *Drosophila* (820 mL de água; 25 g de fermento biológico - *Sacharomyces cerevisiae*; 11g de ágar; 150 g de banana e 1g de nipagin).

O cruzamento padrão (ST) foi realizado por meio de cruzamentos entre fêmeas virgens *flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* e machos *mwh/mwh* (GRAF et al., 1989), enquanto que o cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB) foi realizado por meio de cruzamentos entre fêmeas virgens *ORR; flr³/In(3LR)TM3, ri p^p sep l(3)89Aa bx^{34e} e Bd^S* e machos *mwh/mwh*.

De ambos os cruzamentos, foram obtidos trans-heterozigotos marcados (MH: *mwh + / + flr³*) e heterozigotos balanceados (BH: *mwh + / TM3, Bd^S*).

Os ovos foram coletados, durante um período de oito horas, em frascos contendo uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico *S. cerevisiae* suplementado com sacarose. Após três dias, quando as larvas de 3º estágio (72 ± 4 horas de idade), foram lavadas com água corrente e seguido de água destilada, e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina.

As larvas foram colocadas em frascos de vidro (2,5 cm de diâmetro e 8,0 cm de altura) contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo, Hikari®) e 5 mL de solução com LV e com ES da forma metacestódea de *T. solium*, nas concentrações de 12,5; 25,0 e 50,0 µg/mL; e com soluções aquosas de diferentes derivados do benzimidazol, nas concentrações de 50, 75 e 100%, respectivamente: ABZ (20,0; 30,0 e 40,0mg/mL), CBZ (15,0; 22,5 e 30,0mg/mL), MBZ (10,0; 15,0 e 20,0mg/mL) e TBZ (25,0; 37,5 e 50,0mg/mL). Os controles positivo e negativo, utilizados nos experimentos foram, respectivamente, o uretano (10mM) e PBS para o experimento da forma metacestódea de *T. solium*; e a água destilada estéril, para o experimento dos derivados BZ.

Os tratamentos foram realizados de acordo com o protocolo de tratamento apresentado na **Figura 3**.

Todos os experimentos foram realizados à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, uma vez que, de acordo com Katz e Foley (1993), variações de temperatura podem afetar significativamente a frequência de manchas mutantes.

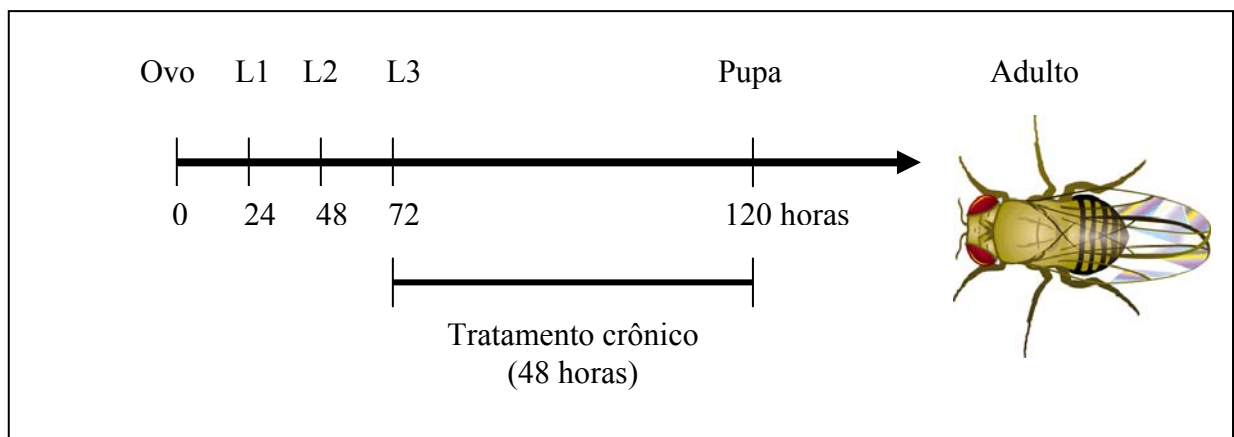


Figura 3. Protocolo do tratamento crônico de larvas de 3º estágio de *D. melanogaster* dos cruzamentos ST e HB.

3.8 Análise microscópica das asas dos adultos emergentes

Adultos emergentes, de ambos cruzamentos, portadores dos dois tipos de genótipos: *mwh* + / + *flr*³ ou *mwh* + / *TM3, Bd*^S foram coletados e conservados em etanol 70%. As asas das moscas foram extraídas com auxílio de microscópio estereoscópico (Olympus®) e um par de pinças entomológicas. As diferenças morfológicas dos cruzamentos ST e HB estão representadas na **Figura 4**.

As asas foram embebidas em solução de Faure (30 g de goma arábica, 20mL de glicerol, 50g de hidrato de cloro e 50mL de água destilada) e distendidas em lâminas de vidro grossa, limpas e secas. Após 24 horas, foi colocada uma gota da solução de Faure sobre as lâminas, as quais foram cobertas com lamínulas (24x32mm) e secas sobre placa aquecida (Etica®) a 37°C.

As asas foram analisadas em microscópio óptico de luz (Olympus®), com aumento de 400X. As células normais formam um único pêlo ou tricoma. Os marcadores genéticos *mwh* e *flr* alteram os tricomas, expressando fenotipicamente no adulto como mancha mutante simples e/ou gêmea, formadas por pêlos múltiplos (*multiple wing hairs*) e/ou pêlos com a base alargada (*flare*). O tamanho da mancha reflete o número de divisões mitóticas ocorridas após a indução da alteração genética. As manchas gêmeas são produzidas exclusivamente pela recombinação mitótica, ao passo que as manchas simples são formadas a partir de vários tipos de eventos mutacionais. As **Figuras 5, 6 e 7** apresentam os esquemas representativos dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento dos diferentes tipos de manchas mutantes.

Durante a análise microscópica, a posição da mancha foi anotada de acordo com o setor em que se encontra na asa. O tamanho de uma mancha foi registrado de acordo com o número de células afetadas, assim como o tipo de alteração existente. Neste caso, considera-se

como mancha simples, alterações de apenas um tipo (mwh ou flr), ou mancha gêmea, quando os dois tipos de alterações estavam presentes na mesma mancha.

Foram analisadas 3594 asas provenientes de adultos emergentes de dois experimentos independentes, em duplicata, de todos os grupos experimentais. Os experimentos incluíram o controle negativo (PBS e água destilada estéril), controle positivo (uretano) e três diferentes concentrações de cada antígeno (LV e ES) e três diferentes concentrações dos agentes BZ (ABZ, CBZ, MBZ e TBZ).

No final da análise foram comparadas as frequências de mutações encontradas nas moscas tratadas com LV e ES da forma metacestódea de *T. solium*; do ABZ, CBZ, MBZ e TBZ, com as observadas nos respectivos controles negativos.

Cruzamento Padrão (ST)
e
Cruzamento de Alta Bioativação Metabólica (HB)

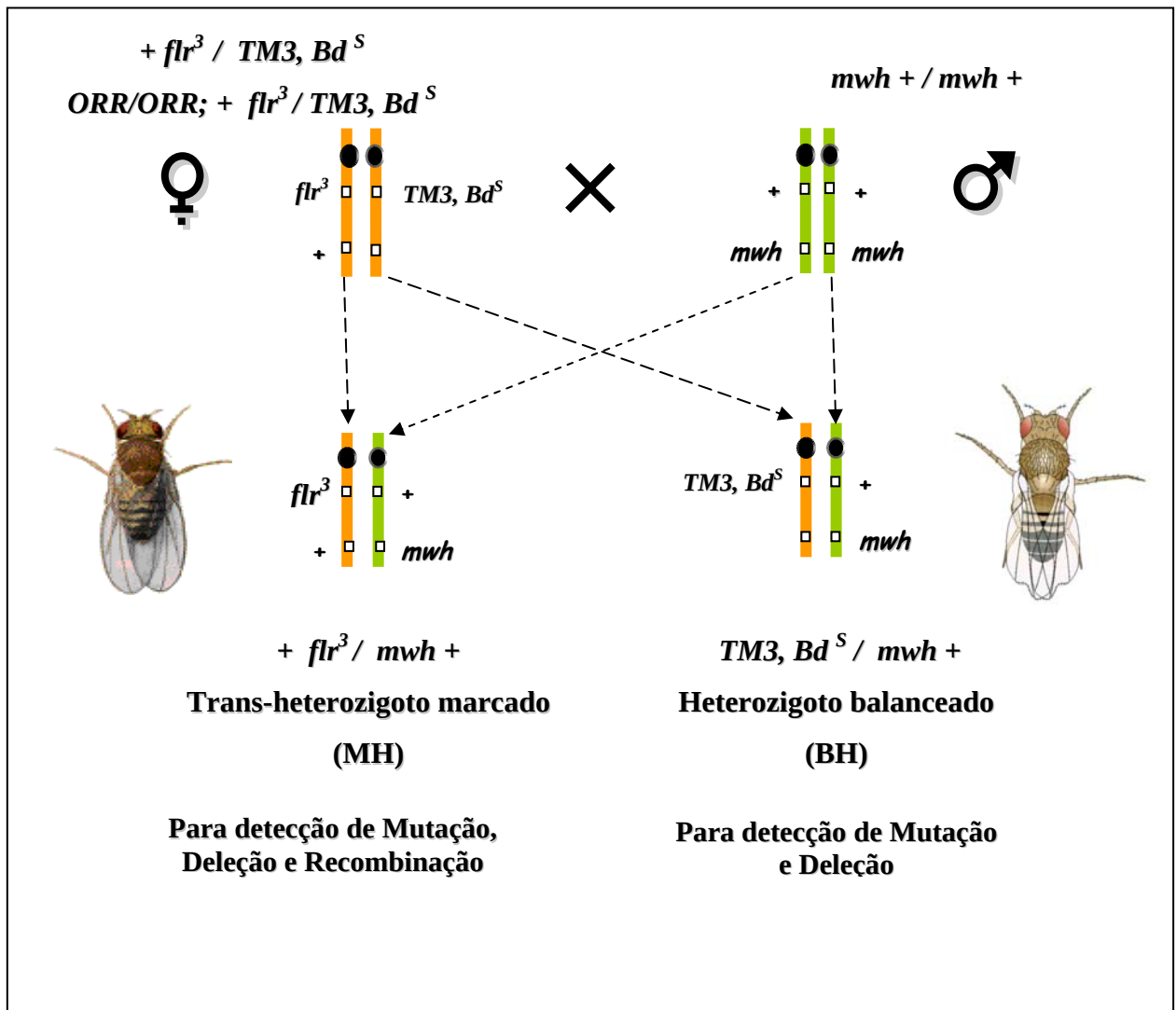


Figura 4. Esquema representativo do cruzamento padrão (ST): Fêmea virgem da linhagem flr^3 ($+ flr^3 / TM3, Bd^S$) cruzada com macho mwh ($mwh + / mwh +$) e do cruzamento de alta bioativação (HB): fêmea virgem da linhagem $ORR/ORR; + flr^3 / TM3, Bd^S$ cruzada com macho mwh ($mwh + / mwh +$), originando descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) ($+ flr^3 / mwh +$) e descendentes heterozigotos balanceados (BH) ($TM3, Bd^S / mwh +$).

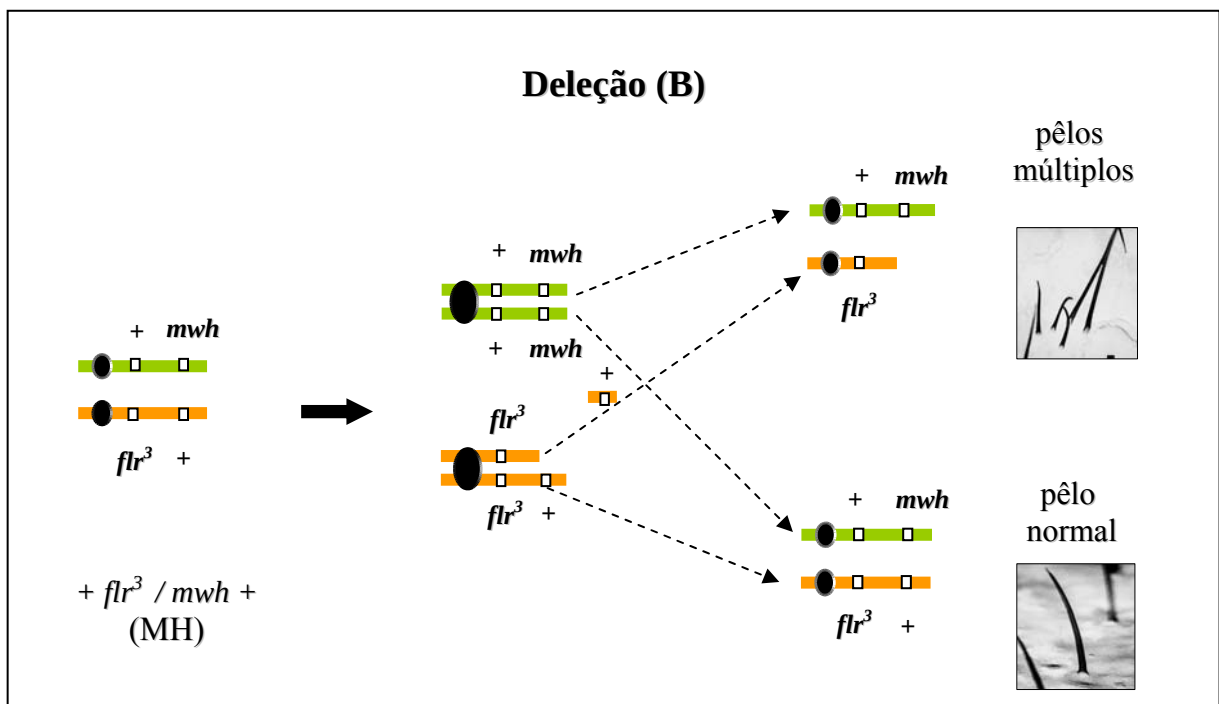
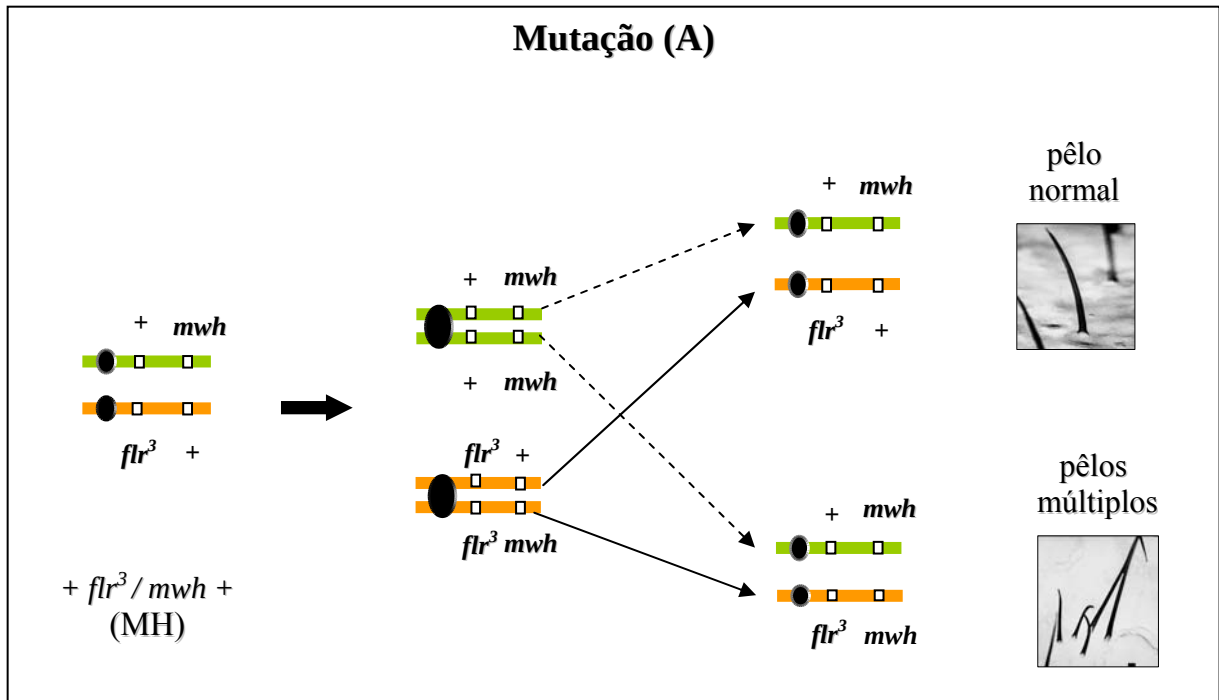


Figura 5. Esquemas representativos dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento de mancha mutantes *mwh* por meio de mutação (A) e deleção (B).

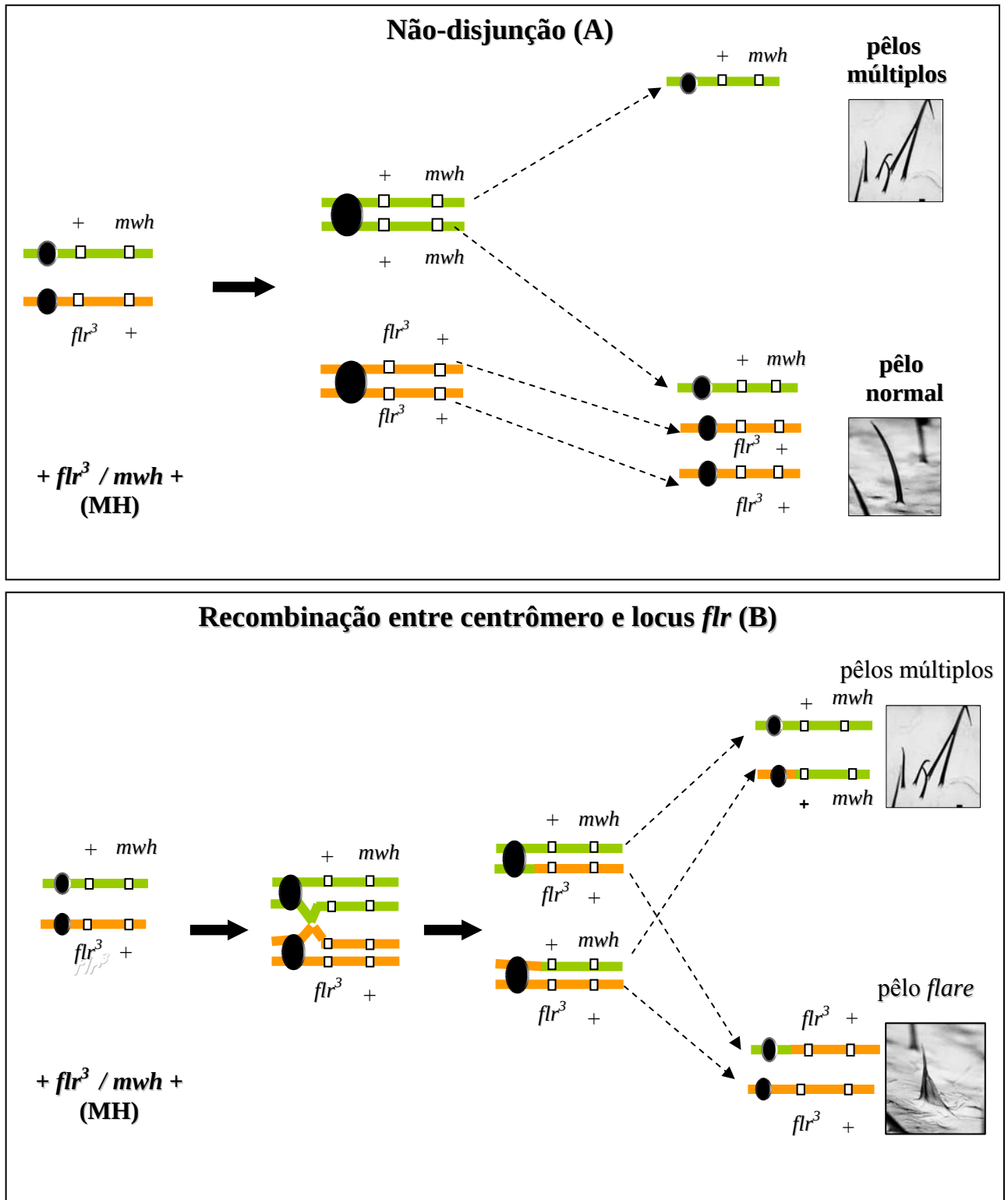


Figura 6. Esquemas representativos dos mecanismos responsáveis pelo aparecimento de manchas mutantes *mwh* por não-disjunção (A) e gêmea por recombinação entre o centrômero e o locus *flr* (B).

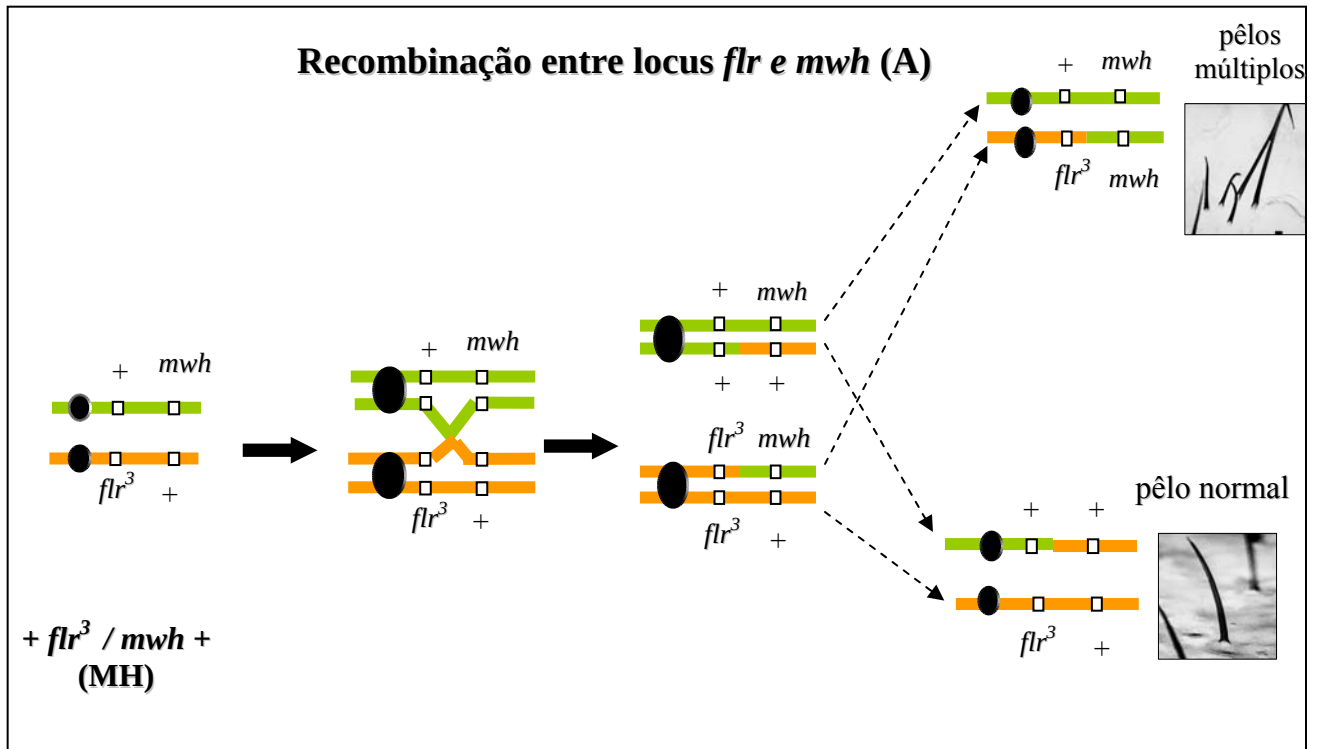


Figura 7. Esquemas representativos de recombinação entre os loci *flare* e *mwh* (A) e dupla recombinação (B) entre o centrômero e locus *flare* e entre o locus *flare* e o *mwh*, responsáveis, respectivamente, pelo aparecimento de manchas simples com pêlos múltiplos e manchas simples com pêlos *flare*.

3.9 Análise estatística

A análise estatística para verificação da possível ação genotóxica das variáveis estudadas foi realizada por meio do teste descrito por Frei; Würgler (1988), utilizando o teste X^2 para proporções, bicaudal, com nível de significância $\alpha=\beta=0,05$.

Foi utilizado um método de múltipla-decisão para definir se o resultado é positivo, inconclusivo ou negativo. A hipótese nula admite que não há diferença na frequência de mutações entre o controle negativo e o indivíduo tratado, enquanto a hipótese alternativa postula, *a priori*, que os resultados encontrados no tratamento têm um aumento nas frequências de mutação que é *m* vezes maior que a frequência espontânea observada no controle (FREI; WÜGLER, 1988).

As manchas mutantes são distribuídas em pequenas simples (1-2 células), grandes simples (>2 células) e manchas gêmeas. Devido às manchas pequenas simples e o total de manchas apresentarem uma frequência espontânea comparativamente alta, *m* é fixado a um valor de 2. Para as manchas grandes simples e gêmeas, que apresentam uma baixa frequência espontânea, considera-se *m* igual a 5 (FREI; WÜGLER, 1988).

Para o cálculo da mutação e recombinação foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Frequência de mutação (FM)} = \frac{\text{Frequência de manchas } mwh \text{ nos descendentes BH}}{\text{Frequência de manchas } mwh \text{ nos descendentes MH}}$$

$$\text{Recombinação} = 1 - \text{frequência de mutação}$$

3.10 Normas de biossegurança

Todo o procedimento de coleta, manuseio do material biológico e dos reagentes, bem como a utilização dos equipamentos, foi realizado de acordo com as normas de segurança compatíveis (CHAVES-BORGES; MINEO, 1997).

4. RESULTADOS

Os cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação (HB) foram realizados simultaneamente para a verificação dos efeitos genotóxicos do líquido de vesícula (LV) e do extrato salino (ES) da forma metacestódea de *T. solium*; e dos agentes BZ: albendazol (ABZ), cambendazol (CBZ), mebendazol (MBZ) e tiabendazol (TBZ) e os respectivos controles positivo e negativo. Desta forma, as larvas obtidas de ambos cruzamentos foram tratadas sob idênticas condições.

As **Tabelas 1** e **2** mostram os resultados das frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) e heterozigotos balanceados (BH), respectivamente, de *D. melanogaster* dos cruzamentos ST e HB, tratados com diferentes concentrações do LV e do ES da forma metacestódea de *T. solium*.

Na **Tabela 1** verifica-se um aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) nas frequências de manchas pequenas simples e nos totais de manchas mutantes induzidas nos indivíduos MH tratados com as diferentes concentrações do ES para ambos cruzamentos, com exceção do tratado com $12,5\mu\text{g/mL}$ do cruzamento HB. Entretanto, esta concentração ($12,5\mu\text{g/mL}$) apresentou valores estatisticamente significantes ($P < 0,05$) em todas as três categorias de manchas.

Os aumentos nas frequências de manchas grandes simples e gêmeas foram estatisticamente inconclusivos para os indivíduos MH tratados com as diferentes concentrações de ES, para ambos cruzamentos, com exceção da menor concentração ($12,5\mu\text{g/mL}$).

Foi verificado aumento estatisticamente significativo ($P < 0,05$) nas frequências de manchas pequenas simples e nos totais de manchas mutantes induzidas nos indivíduos (MH) tratados com as diferentes concentrações do LV do cruzamento HB, enquanto que para o

cruzamento ST, apenas as concentrações de 12,5 e 25,0µg/mL apresentaram aumentos estatisticamente significativos nas frequências totais de manchas mutantes.

Os aumentos nas frequências de manchas grandes simples e gêmeas foram estatisticamente inconclusivos para os indivíduos MH tratados com as diferentes concentrações de LV, para ambos cruzamentos.

Na **Tabela 2** verifica-se que as frequências dos diferentes tipos de manchas mutantes observadas nos indivíduos BH não diferem estatisticamente das frequências de manchas observadas nos controle negativo.

A **Tabela 3** apresenta as porcentagens de mutação e recombinação gênicas, de acordo com as frequências totais de manchas mutantes observadas nos descendentes dos cruzamentos ST e HB. As porcentagens de recombinação variaram de 53-75% apresentando valores elevados em todas as concentrações do LV e ES no cruzamento ST, enquanto que a mutação variou de 23-47%. No cruzamento HB, as porcentagens de recombinação variaram de 36-72%, enquanto a de mutação entre 28-61%.

Os resultados obtidos na análise dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB tratados com diferentes concentrações de agentes BZ, estão apresentados na **Tabela 4 e 5**, respectivamente.

As alterações nas frequências de manchas pequenas simples, grandes simples, gêmeas e o total de manchas mutantes observadas foram estatisticamente não significantes ($P > 0,05$) nos indivíduos tratados com ABZ, CBZ, MBZ e TBZ, quando comparado com as frequências de manchas observadas no controle negativo para o cruzamento ST (**Tabela 4**). O mesmo resultado foi observado para o cruzamento HB.

Diante dos resultados negativos observados nos descendentes MH para os agentes BZ, não foram analisados os descendentes BH.

A **Figura 8** mostra, respectivamente, os resultados da distribuição do total de manchas mutantes observadas em asas dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, após tratamentos com PBS; LV e ES da forma metacestódea de *T. solium* (12,5; 25,0 e 50,0 µg/mL) e uretano (10 mM).

Observam-se elevadas frequências de manchas simples pequenas (1-2 células) nos diferentes tratamentos do cruzamento ST, principalmente nas concentrações de 12,5 e 50,0µg/mL, enquanto que nos tratamentos do cruzamento HB as frequências mais elevadas foram na concentração de 50,0µg/mL. Apesar da menor concentração (12,5µg/mL) apresentar frequência de manchas mais elevada que a de 25 e 50µg/mL no cruzamento ST, não existem diferenças estatisticamente significantes entre as três concentrações dos tratamentos do ES e LV da forma metacestódea de *T. solium*. Observa-se que o LV apresentou resultados semelhantes ao do ES quanto aos tratamentos do cruzamento ST e HB.

As **Figuras 9, 10, 11 e 12** mostram, respectivamente, os resultados obtidos da distribuição do total de manchas mutantes observadas em asas dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, após tratamentos com água; ABZ, CBZ, MBZ e TBZ e uretano (10 mM).

Tabela 1. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) dos cruzamentos ST e HB, após tratamento crônico das larvas de *D. melanogaster* com diferentes concentrações do líquido de vesícula (LV) e do extrato salino (ES) da forma metacestódea de *T. solium*

Tratamento (Concentração)	Número de moscas	Manchas por indivíduo (nº de manchas) Diagnóstico estatístico*													
		Pequenas simples (1-2 células)		Grandes Simples (>2 células)		Gêmeas		Total		Manchas <i>mwh</i>					
		m=2		m=5		m=5		m=2							
A. Cruzamento padrão (ST)															
PBS	30	0,50	(15)		0,03	(01)		0,00	(00)		0,53	(16)		0,50	(15)
Uretano 10mM	30	2,03	(61)	+	0,23	(07)	+	0,17	(05)	+	2,40	(73)	+	2,33	(70)
LV 12,5µg/mL	30	0,93	(28)	+	0,13	(04)	i	0,07	(02)	i	1,13	(34)	+	1,06	(32)
LV 25,0µg/mL	30	0,87	(26)	i	0,07	(02)	i	0,00	(00)	i	0,93	(28)	+	0,90	(27)
LV 50,0µg/mL	30	0,57	(17)	i	0,13	(04)	i	0,00	(00)	i	0,70	(21)	i	0,63	(19)
ES 12,5µg/mL	30	1,39	(43)	+	0,39	(12)	+	0,19	(06)	+	1,97	(61)	+	1,97	(61)
ES 25,0µg/mL	30	0,97	(29)	+	0,13	(04)	i	0,03	(01)	i	1,13	(34)	+	1,06	(32)
ES 50,0µg/mL	30	1,10	(33)	+	0,13	(04)	i	0,03	(01)	i	1,27	(38)	+	1,23	(37)
B. Cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB)															
PBS	30	0.70	(21)		0.13	(04)		0.07	(02)		0.90	(27)		0,90	(27)
Uretano 10mM	30	7.23	(217)	+	1.93	(58)	+	1.03	(31)	+	10.20	(306)	+	10,03	(301)
LV 12,5µg/mL	30	1.93	(58)	+	0.07	(02)	i	0.03	(01)	i	2.03	(61)	+	2,03	(61)
LV 25,0µg/mL	30	1.80	(54)	+	0.23	(07)	i	0.10	(03)	i	2.13	(64)	+	2,07	(62)
LV 50,0µg/mL	37	2.38	(88)	+	0.11	(04)	i	0.03	(01)	i	2.51	(93)	+	2,27	(84)
ES 12,5µg/mL	30	0.80	(24)	-	0.13	(04)	i	0.03	(01)	i	0.97	(29)	-	0,90	(27)
ES 25,0µg/mL	30	1.47	(44)	+	0.30	(09)	i	0.03	(01)	i	1.80	(54)	+	1,60	(48)
ES 50,0µg/mL	30	2.17	(65)	+	0.17	(05)	i	0.07	(02)	i	2.40	(72)	+	2,27	(68)

*Diagnóstico estatístico de acordo com Frei; Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; **m**, fator de multiplicação. Teste do X² para proporções, bicaudal. Níveis de significância: $\alpha=\beta=0,05$.

Tabela 2. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes heterozigotos balanceados (BH) dos cruzamentos ST e HB, após tratamento crônico das larvas de *D. melanogaster* com diferentes concentrações de extrato salino (ES) e líquido de vesícula (LV) da forma metacestódea de *T. solium*

Tratamento (Concentração)	Número de moscas	Manchas por indivíduo (nº de manchas) Diagnóstico estatístico*						
		Pequenas simples (1-2 células)		Grandes Simples (>2 células)		Gêmeas	Total	Manchas <i>mwh</i>
		m=2		m=5		m=5	m=2	
A. Cruzamento padrão (ST)								
PBS	29	0,55 (16)		0,04 (01)		a	0,59 (17)	0,59 (17)
Uretano 10mM	30	2,77 (83)	+	0,23 (07)	+		3,00 (90)	3,00 (90)
LV 12,5µg/mL	28	0,25 (07)	-	0,00 (00)	i		0,25 (07)	0,25 (07)
LV 25,0µg/mL	30	0,23 (07)	-	0,03 (01)	i		0,27 (08)	0,27 (08)
LV 50,0µg/mL	28	0,25 (07)	-	0,04 (01)	i		0,29 (08)	0,29 (08)
ES 12,5µg/mL	30	0,50 (15)	-	0,00 (00)	i		0,50 (15)	0,50 (15)
ES 25,0µg/mL	30	0,50 (15)	-	0,00 (00)	i		0,50 (15)	0,50 (15)
ES 50,0µg/mL	30	0,33 (10)	-	0,00 (00)	i		0,33 (10)	0,33 (10)
B. Cruzamento de alta capacidade de bioativação (HB)								
PBS	30	1,10 (33)		0,03 (01)		a	1,13 (34)	34
Uretano 10mM	30	8,90 (267)	+	0,40 (12)	+		9,30 (279)	9,30 (279)
LV 12,5µg/mL	30	1,17 (35)	-	0,13 (04)	i		1,30 (39)	1,30 (39)
LV 25,0µg/mL	29	0,62 (18)	-	0,03 (01)	i		0,66 (19)	0,66 (19)
LV 50,0µg/mL	28	0,61 (17)	-	0,04 (01)	i		0,64 (18)	0,64 (18)
ES 12,5µg/mL	30	0,40 (12)	-	0,07 (02)	i		0,47 (14)	0,47 (14)
ES 25,0µg/mL	30	0,93 (28)	-	0,00 (00)	i		0,93 (28)	0,93 (28)
ES 50,0µg/mL	30	0,97 (29)	-	0,07 (02)	i		1,03 (31)	1,03 (31)

*Diagnóstico estatístico de acordo com Frei; Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação; a, indivíduos

BH não apresentam manchas flare. Teste do X^2 para proporções, bicaudal. Níveis de significância: $\alpha=\beta=0,05$.

Tabela 3. Porcentagens de mutação e recombinação gênicas nas frequências totais de manchas mutantes observadas nos descendentes dos cruzamentos ST e HB tratados com diferentes concentrações de líquido de vesícula (LV) e extrato salino (ES) da forma metacestódea de *T. solium*

Tratamento	Mutação (%)	Recombinação (%)
Cruzamento ST		
LV 12,5µg/mL	0,26 (23)	0,87 (77)
LV 25,0µg/mL	0,28 (30)	0,65 (70)
LV 50,0µg/mL	0,32 (46)	0,38 (54)
ES 12,5µg/mL	0,49 (25)	1,48 (75)
ES 25,0µg/mL	0,53 (47)	0,60 (53)
ES 50,0µg/mL	0,34 (27)	0,93 (73)
Cruzamento HB		
LV 12,5µg/mL	1,30 (64)	0,67 (36)
LV 25,0µg/mL	0,68 (32)	1,45 (68)
LV 50,0µg/mL	0,70 (28)	1,80 (72)
ES 12,5µg/mL	0,50 (52)	0,47 (48)
ES 25,0µg/mL	1,04 (58)	0,76 (42)
ES 50,0µg/mL	1,08 (45)	1,32 (55)

Tabela 4. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento ST tratados com diferentes concentrações de albendazol (ABZ), cambendazol (CBZ), mebendazol (MBZ) e tiabendazol (TBZ)

Tratamento (Concentração)	Número de moscas	Manchas por indivíduo (nº de manchas) Diagnóstico estatístico*							
		Pequenas simples (1-2 células)		Grandes Simples (>2 células)		Gêmeas		Total	
		m=2		m=5		m=5		m=2	
Água	30	0,63	(19)	0,30	(09)	0,17	(05)	1,10	(33)
ABZ 20mg/mL	30	0,70	(21) -	0,07	(02) -	0,03	(01) -	0,80	(24) -
ABZ 30mg/mL	40	0,38	(15) -	0,08	(03) -	0,08	(03) -	0,53	(21) -
ABZ 40mg/mL	30	0,70	(21) -	0,00	(00) -	0,00	(00) -	0,70	(21) -
CBZ 15mg/mL	30	0,47	(14) -	0,03	(01) -	0,07	(02) -	0,57	(17) -
CBZ 22,5mg/mL	28	0,25	(07) -	0,04	(01) -	0,04	(01) -	0,32	(09) -
CBZ 30mg/mL	30	0,27	(08) -	0,07	(02) -	0,00	(00) -	0,33	(10) -
MBZ 10mg/mL	30	0,27	(08) -	0,13	(04) -	0,00	(00) -	0,40	(12) -
MBZ 15mg/mL	30	0,57	(17) -	0,00	(00) -	0,03	(01) -	0,60	(18) -
MBZ 20mg/mL	30	0,30	(09) -	0,10	(03) -	0,00	(00) -	0,40	(12) -
TBZ 25mg/mL	52	0,33	(17) -	0,19	(10) -	0,04	(02) -	0,56	(29) -
TBZ 37,5mg/mL	64	0,27	(17) -	0,13	(08) -	0,03	(02) -	0,42	(27) -
TBZ 50mg/mL	53	0,32	(17) -	0,09	(05) -	0,02	(01) -	0,43	(23) -
Uretano 10mM	30	2,03	(61) +	0,70	(21) +	0,50	(15) +	3,23	(97) +

*Diagnóstico estatístico de acordo com Frei; Würbler (1988): +, positivo; -, negativo; **m**, fator de multiplicação. Teste do X^2 para proporções, bicaudal. Níveis de significância: $\alpha=\beta=0,05$.

Tabela 5. Frequências de manchas mutantes observadas nos descendentes MH de *D. melanogaster* do cruzamento HB tratados com diferentes concentrações de albendazol (ABZ), cambendazol (CBZ), mebendazol (MBZ) e tiabendazol (TBZ).

Tratamento (Concentração)	Número de moscas	Manchas por indivíduo (nº de manchas) Diagnóstico estatístico*							
		Pequenas simples (1-2 células)		Grandes Simples (>2 células)		Gêmeas		Total	
		m=2		m=5		m=5		m=2	
Água	30	1,57	(47)	0,37	(11)	0,20	(06)	2,13	(64)
ABZ 20mg/mL	30	1,00	(30) -	0,03	(01) -	0,00	(00) -	1,03	(31) -
ABZ 30mg/mL	30	0,30	(09) -	0,13	(04) -	0,00	(00) -	0,43	(13) -
ABZ 40mg/mL	30	0,77	(23) -	0,07	(02) -	0,10	(03) -	0,93	(28) -
CBZ 15mg/mL	30	0,93	(28) -	0,07	(02) -	0,10	(03) -	1,10	(33) -
CBZ 22,5mg/mL	30	1,73	(52) -	0,07	(02) -	0,10	(03) -	1,90	(57) -
CBZ 30mg/mL	30	1,00	(30) -	0,20	(06) -	0,07	(02) -	1,27	(38) -
MBZ 10mg/mL	30	0,90	(27) -	0,07	(02) -	0,03	(01) -	1,00	(30) -
MBZ 15mg/mL	30	1,37	(41) -	0,23	(07) -	0,07	(02) -	1,67	(50) -
MBZ 20mg/mL	30	0,80	(24) -	0,03	(01) -	0,10	(03) -	0,93	(28) -
TBZ 25mg/mL	30	0,73	(22) -	0,20	(06) -	0,10	(03) -	1,03	(31) -
TBZ 37,5mg/mL	30	0,43	(13) -	0,13	(04) -	0,00	(00) -	0,57	(17) -
TBZ 50mg/mL	30	0,87	(26) -	0,20	(06) -	0,10	(03) -	1,17	(35) -
Uretano 10mM	30	6,57	(197) +	2,97	(89) +	0,80	(24) +	10,33	(310) +

*Diagnóstico estatístico de acordo com Frei; Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; **m**, fator de multiplicação. Teste do X^2 para proporções, bicaudal. Níveis de significância: $\alpha=\beta=0,05$.

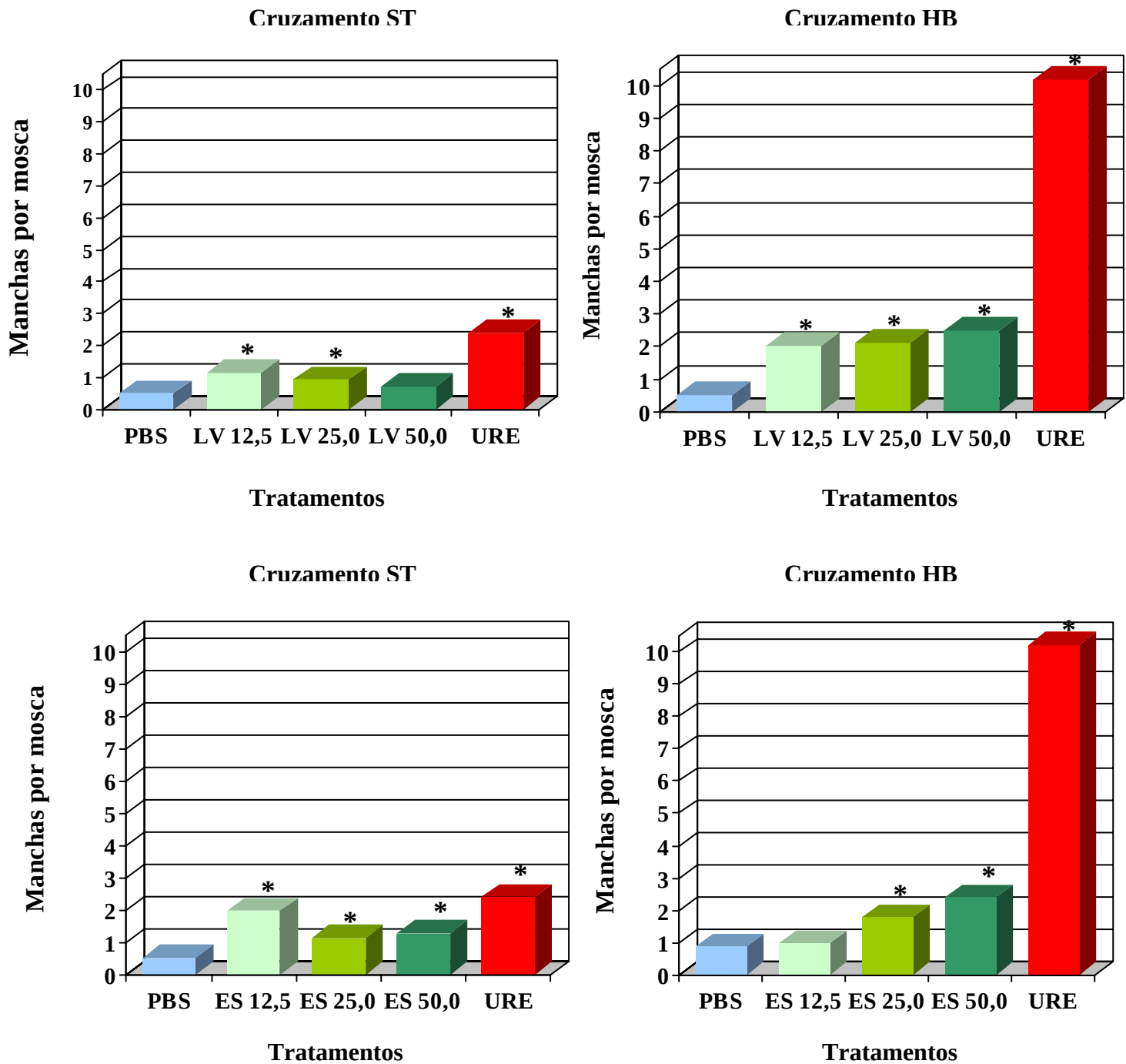
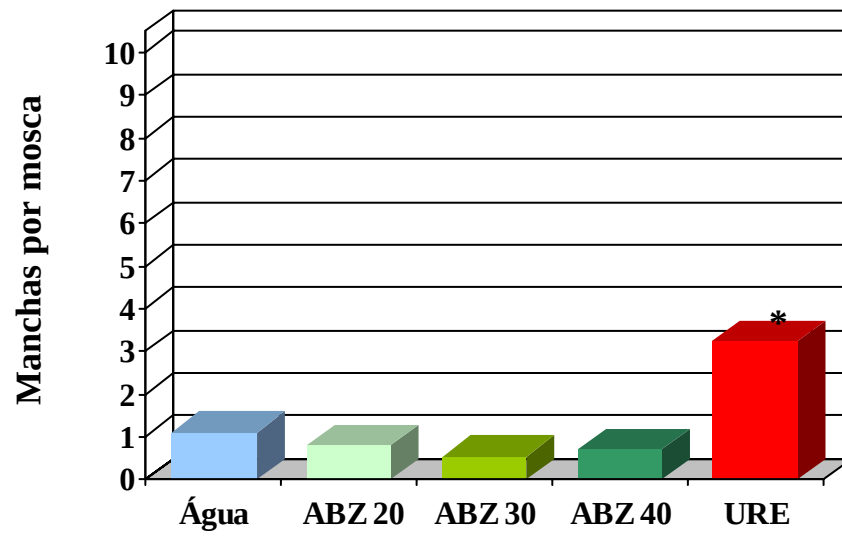


Figura 8. Distribuição do total de manchas mutantes observadas em asas dos descendentes trans-heterozigotos marcados (MH) dos cruzamentos padrão (ST) e de alta capacidade de bioativação (HB), após tratamentos com PBS, líquido de vesícula (LV) e do extrato salino (ES) da forma metacestódea de *T. solium* (12,5; 25,0 e 50,0 µg/mL) e uretano (10 mM).

*Estatisticamente significante quando comparado com o controle negativo.

ST



HB

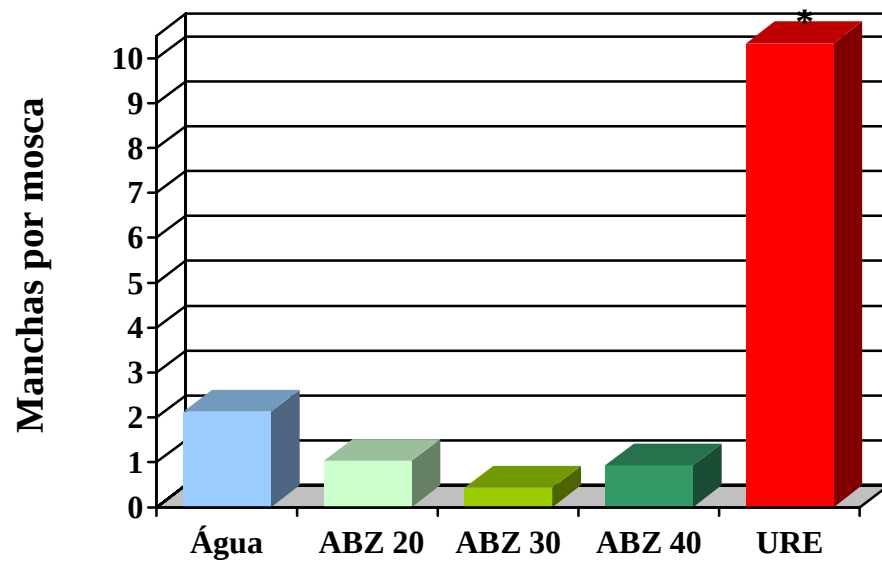
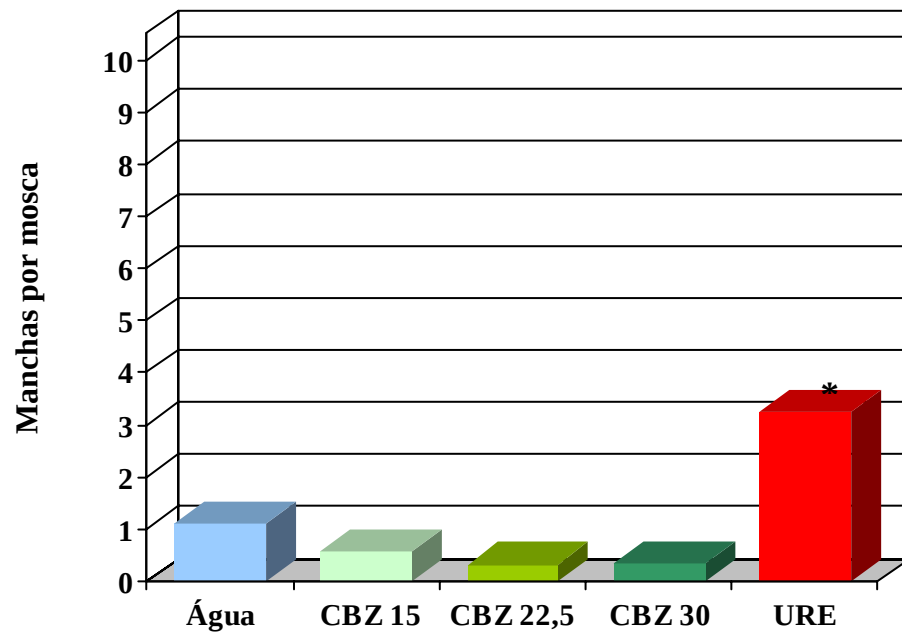


Figura 9. Distribuição do total de manchas mutantes observadas em asas dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, após tratamentos com água, Albendazol (ABZ 20; 30 e 40mg/mL) e uretano (10mM). *Estatisticamente significativo quando comparado com o controle negativo.

ST



HB

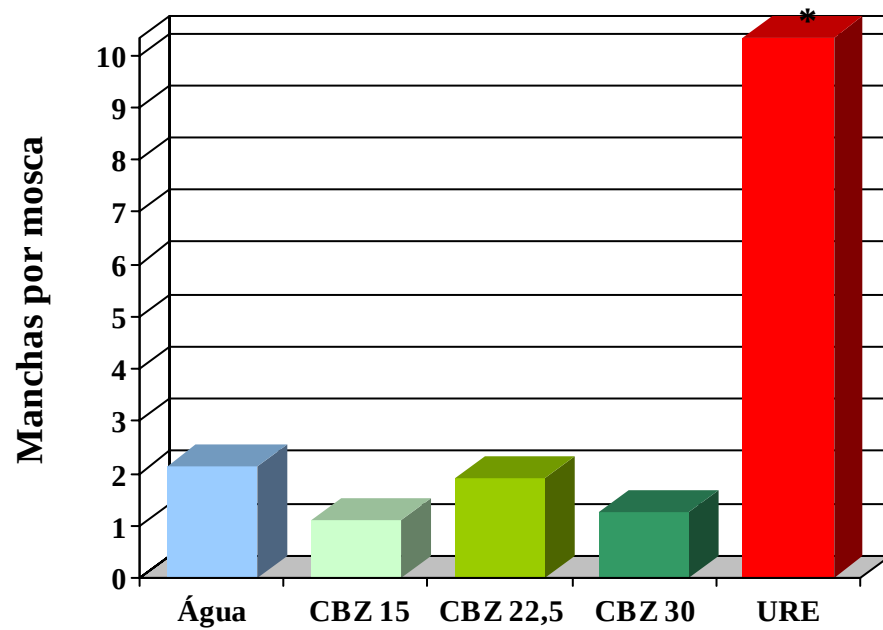
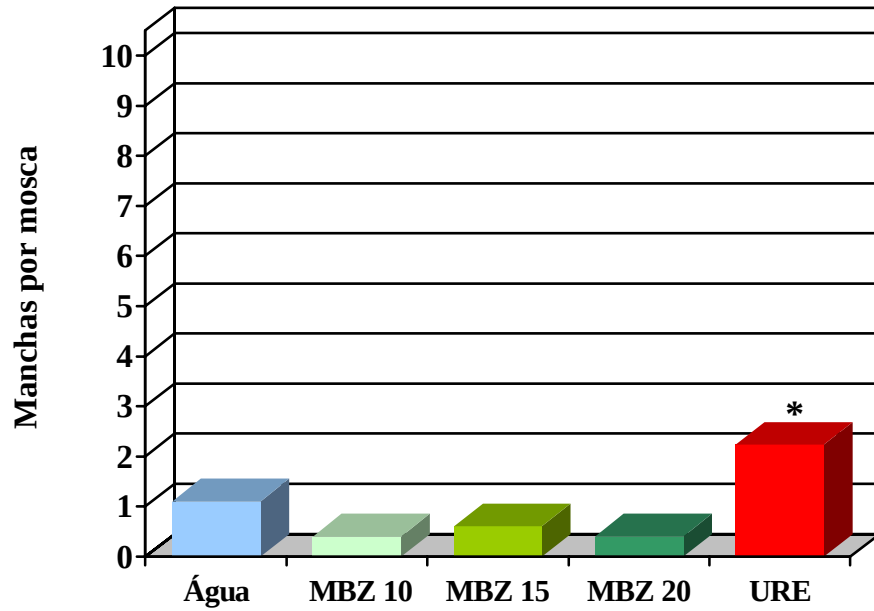


Figura 10. Distribuição do total de manchas mutantes observadas em asas dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, após tratamentos com água; Cambendazol (CBZ 15; 22,5 e 30mg/mL) e uretano (10mM). *Estatisticamente significante quando comparado com o controle negativo.

ST



HB

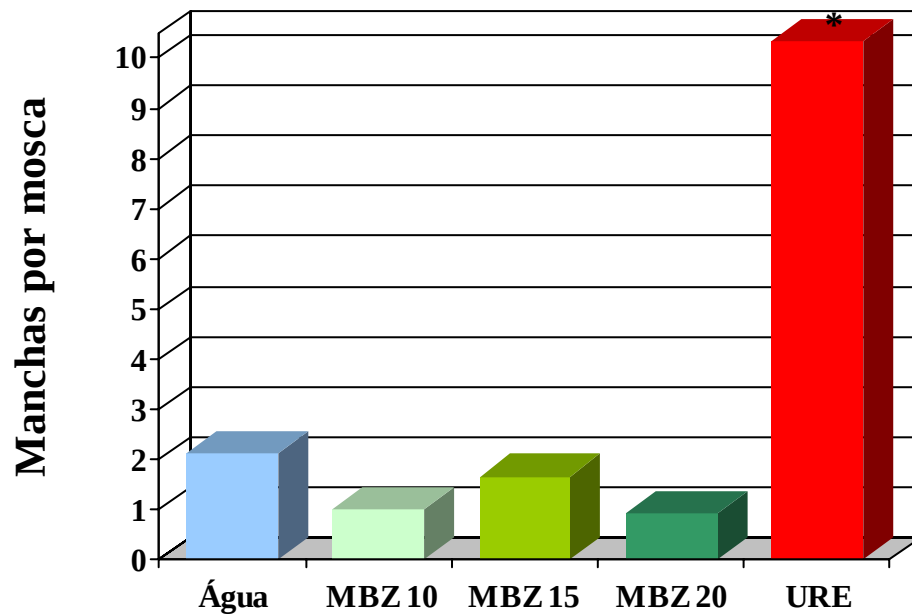
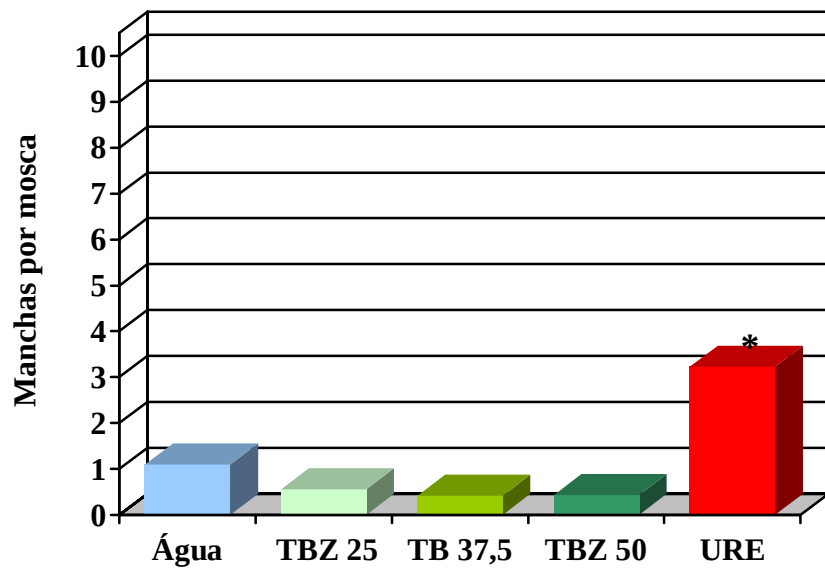


Figura 11. Distribuição do total de manchas mutantes observadas em asas dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, após tratamentos com água; Mebendazol (MBZ 10; 15 e 20mg/mL) e uretano (10mM). *Estatisticamente significante quando comparado com o controle negativo.

ST



HB

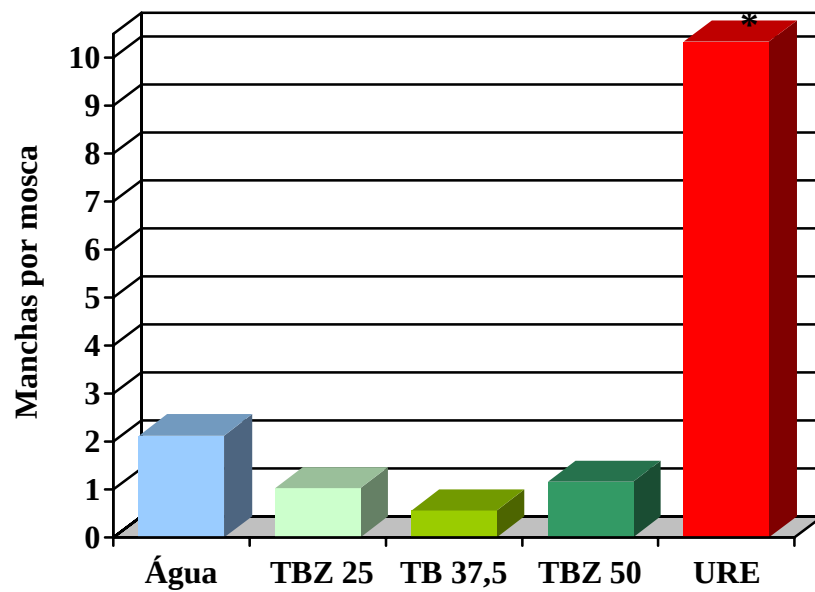


Figura 12. Distribuição do total de manchas mutantes observadas em asas dos descendentes MH dos cruzamentos ST e HB, após tratamentos com água; Tiabendazol (TBZ 25; 37,5 e 50mg/mL) e uretano (10mM). *Estatisticamente significante quando comparado com o controle negativo.

5. DISCUSSÃO

A mosca da fruta *D. melanogaster* está destinada a se tornar um dos modelos preferidos na pesquisa do câncer, pois esta apresenta aproximadamente 13.000 genes, sendo que a maioria dos 30.000-40.000 genes humanos são resultados de duplicações e rearranjos de genes equivalentes neste inseto. Adicionalmente, um número significativo de genes estudados neste modelo experimental provou ser homólogo de genes supressores de tumor e oncogenes humanos. Diante disso, o teste SMART possui requisitos essenciais para estudos de genotoxicidade e seus mecanismos moleculares, podendo fornecer respostas relevantes para o homem, com um alto índice de acerto (MIKLOS, RUBIN, 1996; St JOHN, XU, 1997).

O ensaio com *D. melanogaster*, além de utilizar um organismo experimental eucariótico, com alta similaridade genética (~80%) e bioquímica, quando comparado aos mamíferos, tem a vantagem de ser um teste *in vivo* rápido e reproduzível, possibilitando a detecção e quantificação simultânea de mutações gênicas e cromossômicas – representadas por eventos aneugênicos (perda de cromossomos inteiros) e clastogênicos (perda de fragmentos cromossômicos) – e/ou recombinação somática, com ênfase sobre eventos relacionados com recombinação homóloga (GRAF et al., 1984; COOKSON, 1997; SPANÓ et al., 2001).

A detecção de genotoxicidade direta é realizada por meio do cruzamento padrão (baixa atividade metabólica) e a indireta por meio do cruzamento de alta bioativação, que é capaz de ativar enzimaticamente pro-mutágenos e pro-carcinógenos por apresentar altos níveis constitutivos de citocromo P450 (subclasse CYP6A2), que consiste de várias formas de isoenzimas capazes de metabolizar uma variedade de substratos (ANDRADE, LEHMANN, 2003).

Quanto ao controle positivo, o uretano é um promutágeno que pode ocorrer naturalmente em alguns fermentos alimentícios (OUGH, 1976). Ribovich et al. (1982) e

Miller, Miller (1983) propuseram a via metabólica do vinilcarbamato que, após peroxidação, origina aductos no DNA e RNA. Etilcarbamato tem potencial genotóxico em *Drosophila*, com uma evidente dose-resposta e dependência da ativação metabólica. A via metabólica mais provável é a que envolve a atividade enzimática do citocromo P450-dependente (FRÖLICH, WÜRGLER, 1990).

As fontes de exposição humana a agentes mutagênicos podem ser classificadas como endógenas, ocupacional, dieta, radiação, poluição e biológica. Os parasitos estão classificados dentro dos biológicos, porém desencadeam outros agentes endógenos (óxido nítrico, radicais livres de oxigênio) potencializando a ação mutagênica (HERRERA et al., 2000).

Até o momento, nenhum dado foi encontrado, na literatura científica, sobre os efeitos genotóxicos dos antígenos presentes na forma metacestódea de *T. solium*, bem como sobre os efeitos genotóxicos de agentes antiparasitários BZ utilizando o teste SMART, sendo, portanto, este trabalho uma idéia original e inédita.

As infecções crônicas contribuem 13% para a indução de cânceres no mundo. Helminthíases, particularmente trematódeos e *Fasciola hepatica* têm sido identificadas como uma das maiores causas de cânceres em humanos, sendo classificados pela OMS como carcinógenos de classe I (WHO/IARC, 1994).

O impacto das infecções parasitárias na incidência do câncer é importante, especialmente em países onde indivíduos albergam parasitos vivos por longos períodos (inflamação crônica), aumentando a chance de transformações malignas. Nestes países a população está exposta a outros xenobióticos, elevando a probabilidade de carcinogênese em indivíduos parasitados, devido ao resultado de interação de múltiplos fatores de risco para o câncer (HERRERA et al., 2001).

A NCC, uma helmintíase do SNC originada pela forma metacestódea de *T. solium*, tem sido associada a vários danos no DNA em linfócitos circulantes de animais e pacientes infectados (MONTERO et al., 1994; HERRERA et al., 1994; 2000; 2001).

Várias hipóteses têm sido propostas para explicar a associação entre infecções parasitárias e tumores malignos. A formação de ERO e nitrogênio pelas células inflamatórias, invadidas pelos patógenos, induz a instabilidade no DNA em tecidos normais. A resposta proliferativa de células do hospedeiro para reparar danos no tecido e a alteração do metabolismo de xenobióticos por células inflamatórias têm sido propostos como prospectivos pelo qual uma resposta inflamatória crônica contribui para parasitos induzirem a carcinogênese (HERRERA et al., 2003).

Não está claro como um parasito do SNC pode induzir danos genéticos e transformações malignas em células sistêmicas. Um mecanismo potencial provável pode ser por meio da interação de fatores solúveis secretados pela metacestódea com as células hospedeiras (HERRERA et al., 2003).

Diversos fatores, secretados por outros helmintos, estão envolvidos na promoção e progressão de tumores, como o antígeno solúvel de ovos de *Schistosoma* que apresenta uma significativa atividade promotora de tumor (ISHII et al., 1989). Alguns componentes de secreção-excreção larval de *T. taeniaeformis* induzem hiperplasia de estômago em ratos infectados (KONNO et al., 1999).

Fatores secretados pela forma metacestódea de *T. solium* podem potencialmente alterar a homeostasia das células hospedeiras (WHITE; TATO; MOLINARI, 1992). Um peptídeo de RNA secretado por metacestódea de *T. solium* inibe a proliferação induzida por mitógenos da resposta humoral e celular a antígenos de metacestódea (TATO et al., 1995; ARECHAVALETA et al., 1998). Herrera et al. (1994) demonstraram que este fator induz transformações morfológicas em células de embrião de hamster Syrian *in vitro*. Também foi

demonstrado por Herrera et al. (2003) que um fator de secreção (RNA) causa danos no DNA, em cultura de linfócitos humanos, por meio do teste do MN.

Neste estudo foi descrito a atividade recombinogênica e genotóxica do LV e ES da forma metacestódea de *T. solium*, investigado em células somáticas de *D. melanogaster* em ambos cruzamentos ST e HB.

O número de descendentes MH, obtidos dos cruzamentos ST e HB, foi semelhante em todos os tratamentos crônicos com diferentes concentrações de ES e LV (12,5; 25,0 e 50,0 µg/mL), não apresentando efeitos citotóxicos.

Com relação à avaliação genotóxica, as altas frequências de manchas mutantes observadas nos indivíduos tratados com ES e LV, nos descendentes do cruzamento ST indicam que o ES e o LV apresentam efeito genotóxico direto, entretanto sem apresentarem diferenças estatisticamente significantes. Estes resultados são concordantes com os resultados de Herrera et al. (2003) que verificaram a mutagenicidade do fator de secreção e excreção pelo teste do MN em culturas de linfócitos humanos nas concentrações de 20 e 80 µg/mL do fator, não havendo diferença estatisticamente significativa entre as concentrações.

A maioria das moléculas descritas encontra-se na membrana do parasito, nas mitocôndrias ou no núcleo. Dentre os marcadores de membrana salienta-se o glicolípido GSL-I (glycosphingolipid-I) que é uma β -galactopyranosyl-1-ceramide, uma molécula de ceramida que se relaciona com a imunomodulação. As diferentes composições lipídicas das glicosilceramidas têm sido postuladas como reguladoras da transição morfológica, estádios de desenvolvimento, diferenciação, oncogênese e estabilidade de membrana de tenídeos (WUHRER et al., 2000; HOBERG, 2002).

Em várias infecções parasitárias, os carboidratos apresentam a capacidade de participar na modulação e evasão da resposta imune, estabilizando a relação parasito-hospedeiro e bloqueando a imunidade (BUTTERWORTH et al., 1988). Além disso, os

carboidratos são altamente antigênicos e em alguns casos são os responsáveis pela reatividade cruzada entre diferentes espécies (CUMMINGS, NYAME, 1996).

Proteínas ou seus fragmentos utilizados como antígenos podem conter fatores imunodominantes e imunossupressores. A paramiosina de espécies de *Schistosoma* e seus homólogos em *T. solium*, também conhecido como antígeno B (AgB), são proteínas imunodominantes envolvidas na complexa relação parasito-hospedeiro. Este parece ser um candidato promissor à vacinação, a qual exhibe propriedades que indicam seu papel imunomodulatório, em particular, prejudicando o aumento da resposta inflamatória do hospedeiro, através da inibição da via clássica da cascata do complemento (LACLETTE et al., 1992).

O efeito mutagênico do LV e ES em asas de *D. melanogaster* pode ser explorado pela interação dos constituintes dos antígenos, citados acima, com o sistema de ativação do citocromo P-450 elevando a formação deste metabólito ativo.

As altas frequências, estatisticamente significantes, de manchas mutantes simples pequenas (**Tabela 1**) indicam que o LV e ES induziram mutações pontuais, alterações cromossômicas e recombinação mitótica durante o último e/ou penúltimo ciclos de divisão mitótica na pupa. Além disso, deficiências genéticas devidas às mutações cromossômicas do tipo aneuploidia e/ou grandes deleções levam, geralmente, somente à formação de manchas simples pequenas, independente do tempo em que estas foram induzidas, já que estas células apresentam uma baixa taxa de proliferação celular (GRAF et al., 1984).

Manchas gêmeas são originadas exclusivamente por recombinação, o que significa que os dados obtidos com ES nos descendentes MH fornecem indicações preliminares sobre a ação recombinogênica, enquanto que para o LV o número de moscas deve ser aumentado, para esclarecer valores inconclusivos, de acordo com Frei, Würzler (1988).

O teste SMART tem sido aplicado para estudos qualitativos e quantitativos ou para estabelecer relações entre estrutura/efeito de uma série de compostos, provando ser suficientemente sensível para o estabelecimento das relações entre estrutura química e respostas diferenciais para eventos mutagênicos e recombinogênicos.

Neste trabalho, realizou-se a determinação dos efeitos genotóxicos de quatro agentes BZ com objetivo de caracterizar as relações estrutura/atividade, procurando identificar os grupos substituintes, que possam contribuir de forma mais significativa para a genotoxicidade dos diferentes análogos. Não foram identificados diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes compostos, mostrando não haver relação entre estrutura e atividade genotóxica, nas condições do presente trabalho.

Estudos citogenéticos, realizados em animais, com o objetivo de determinar os efeitos genotóxicos de agentes químicos, são de valor limitado no que diz respeito à extrapolação para humanos, uma vez que as doses utilizadas são, geralmente, muitas vezes maiores que as doses empregadas em humanos. No entanto, esses estudos são extremamente úteis, como testes de triagem, para a detecção de agentes genotóxicos (MELO et al., 1996).

Os agentes BZ interferem na produção de energia, com consequente paralisia muscular e morte do parasito. A maioria inibe a enzima furamato redutase. ABZ, CBZ, MBZ e TBZ atuam inibindo a polimerização dos microtúbulos, que pode resultar em aneuploidia, e inibindo o transporte de glicose, levando à morte celular (MAILHES; MARCHETTI, 1994). Entretanto, alguns estudos discordam da capacidade de induzir genotoxicidade.

Existem agentes carcinogênicos e mutagênicos que, dependendo do tipo de célula e exposição, também são anticarcinogênicos e antimutagênicos. Devido a esta ambiguidade, foram denominados de Janus carcinógenos e mutágenos, em alusão ao deus romano, que tinha duas faces, em direções opostas (von BORSTEL; HIGGINS, 1998).

Haseman e Johnson (1996) notaram atividade anticarcinogênica em 200 compostos previamente considerados carcinogênicos. Os resultados encontrados podiam ser explicados por três possibilidades: padrão de variabilidade, toxicidade órgão específica, correlação de carcinogênese e anticarcinogênese com o peso corporal e a dose administrada.

Os compostos BZ se enquadram nesta classificação. De acordo com Vélík et al. (2004) estes compostos têm a capacidade de modulação de enzimas biotransformadoras da família CYP, não sendo observado indução de CYP em modelo humano, para os agentes BZ testados neste trabalho.

Entende-se por biotransformação as seguintes fases: 1) oxidação, redução e hidrólise da droga, onde estão incluídos o sistema enzimático P450 (CYP) e flavina contendo monooxigenases (FMO); 2) a droga ou o metabólito da fase 1 conjuga-se a compostos endógenos; e 3) transporte de substratos, metabólitos ou conjugados através da membrana, mediados por proteínas transportadoras (VELÍK et al., 2004).

Em múltiplas reações metabólicas, que envolvem a transferência de elétrons em células aeróbicas, são formadas espécies reativas de oxigênio (ERO). Estas ERO também podem resultar do metabolismo de certas drogas e causam peroxidação de lipídios, alterações em proteínas e em ácidos nucléicos, produzindo danos às células (HONKAKOSKI; NEGISHI, 1997).

De acordo com a atividade enzimática de cada isoforma CYP, pode-se dividir em: 1) Os metabolizadores extensivos, tendo isoforma com atividade normal, não apresentando problemas para biotransformar os fármacos por ela metabolizados; e 2) Os metabolizadores pobres, que têm a atividade da isoforma diminuída ou nula, podendo levar a diferenças significativas na posologia de alguns fármacos. Além do polimorfismo genético, a biotransformação de fármacos pelo fígado é influenciada por fatores como idade, tabagismo, nutrição e doenças hepáticas, entre outros (CONFORTI-FROES; EL-ZEIN; AU, 1998).

Tanto no cruzamento ST quanto no HB, os resultados mostraram-se estatisticamente não significativos, indicando que o ABZ, CBZ, MBZ e TBZ não possuem efeitos mutagênicos e recombinogênicos no teste de asas em *D. melanogaster*.

Os derivados BZ, além de Janus carcinógenos e mutágenos, de acordo com a dose e tipo de exposição celular, seriam indutores de aneuploidia em altas concentrações, como descrito por Mailhes et al. (1997).

Os agentes BZ por inibirem a polimerização dos microtúbulos têm sido reportados como aneugênicos em sistemas testes *in vitro* (DAYAN, 2003).

O ABZ além de ser antiparasitário tem sido utilizado como quimioterápico do câncer. Um estudo realizado *in vivo* e *in vitro* demonstrou que o ABZ suprimiu o crescimento hepatocelular de células neoplásicas (POURGHOLAMI et al., 2001). Resultados negativos foram obtidos no teste de AMES, aberração cromossômica e testes de transformação celular 3T3 *in vitro*. A atividade carcinogênica está na dependência da concentração (DAYAN, 2003).

O TBZ tem demonstrado ser um Janus carcinógeno, dependente da dosagem e do tipo celular. A substituição de uma base na estrutura química parece ser o principal mecanismo de ação (von BORSTEL; HIGGINS, 1998).

Mailhes et al. (1997) mostraram que o TBZ, diferente de seus análogos estruturais e funcionais. Não tem um potente efeito aneugênico em oócitos de camundongos. No entanto, em doses altas e tóxicas, o TBZ pode induzir aneuploidia em células germinativas, indicando que este é, no máximo, um fraco aneugênico tanto em células somáticas, quanto em células germinativas *in vivo*.

A maioria dos carcinógenos químicos não é capaz de causar efeitos danosos por si. O metabolismo desses compostos é a parte crucial da resposta inicial. Portanto, os distúrbios causados no balanço entre os processos de ativação e detoxificação podem explicar as

variações individuais em resposta à exposição ao carcinógenos. A quantidade de compostos carcinogênicos finais produzidos depende da ação competitiva entre os passos de ativação e detoxificação, envolvendo as enzimas do citocromo P450 e das S-glutathione transferases (CONFORTI-FROES; EL-ZEIN; AU, 1998).

Os resultados não genotóxicos para os compostos ABZ, CBZ, MBZ e TBZ em células somáticas de *D. melanogaster* podem ser explicados pelas doses testadas e o tipo celular, mediante as características conhecidas dos Janus carcinógenos, que dependem do tipo celular e da concentração envolvida.

6. CONCLUSÕES

O presente estudo permitiu evidenciar, por meio do teste de mutação e recombinação somática em *D. melanogaster*, que nas condições experimentais utilizadas: o LV e o ES da forma metacestódea de *T. solium* possuem atividade genotóxica, com a atividade recombinogênica prevalecendo sobre as atividades mutagênicas e clastogênicas. Entretanto, estudos avaliando a atividade metabólica de LV e ES da forma metacestódea de *T. solium* precisam ser delineados, para que se possa entender o exato mecanismo envolvido.

Os quatros agentes BZ: ABZ, CBZ, MBZ e TBZ não possuem efeitos genotóxicos em células de *D. melanogaster*. Não há diferenças nas relações estrutura/atividade desses agentes antiparasitários quanto aos parâmetros analisados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AIX, L.; REY-GROBELLET, X.; LARRIEU, G.; LESCA, P.; GALTIER, P. Thiabendazole is an inducer of cytochrome P4501A1 in cultured rabbit hepatocytes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.202, p.1483-1489, 1994.
- ANDRADE, H.H.R.; LEHMANN, M. Teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. IN: RIBEIRO, L.R.; SALVADORI, D.M.F.; MARQUES, E.K. **Mutagênese ambiental**. Porto Alegre: Editora ULBRA, p.281-307, 2003.
- ANTOCCIA, A.; DEGRASSI, F.; BATTISTONI, A.; CILIUTTI, P.; TANZARELLA, C. *In vitro* micronucleus test with kinetochore staining: evaluation of test performance. **Mutagenesis**, v.6, p.319-324, 1991.
- ANTONIUK, S. Epidemiología de la neurocisticercosis, **Revista de Neurologia**, v.29, p.331-334, 1999.
- ANTUNES, L.M.G.; TAKAHASHI, C.S. Cytogenetic effects of mebendazole on *in vivo* and *in vitro* mammalian systems. **Revista Brasileira de Genética**, v.17, p.273-276, 1994.
- ASTEINZA, J.; CAMACHO-CARRANZA, R.; REYES-REYES, R.E.; DORADO-GONZÁLEZ, V.; ESPINOSA-AGUIRRE, J.J. Induction of cytochrome P450 enzymes by albendazole treatment in the rat. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.9, p.31-37, 2000.
- ARECHAVALETA, F.; MOLINARI, J.L.; TATO, P. A *Taenia solium* metacestode factor nonspecifically inhibits cytokine production. **Parasitology Research**, v.84, p.117-122, 1998.
- BALIHAROVÁ, V.; SKÁLOVÁ, L.; MAAS, R.F.M.; DE VRIEZE, G.; BULL, S.; FINK-GREMMELS, J. The effects of benzimidazole anthelmintics on P4501A in rat hepatocytes and HepG2 cells. **Research in Veterinary Science**, v.75, p.61-69, 2003.

*Segundo Normas da ABNT NBR 6023:2002

BARCELOS, I.S.C.; MINEO, J.R.; SILVA, D.A.O.; FERREIRA, M.S.; MOURA, L.P.; BIONDI, G.F.; COSTA-CRUZ, J.M. Detection of IgG in cerebrospinal fluid for diagnosis of neurocysticercosis: evaluation of saline and SDS extracts from *Taenia solium* and *Taenia crassiceps* metacestodes by ELISA and immunoblot assay. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, p.219-226, 2001.

BAARS, A.J. Biotransformation of xenobiotics in *Drosophila melanogaster* and its relevance for mutagenicity testing. **Drug Metabolism Reviews**, v.11, p.191-221, 1980.

BENNETT, A.; GUYATT, H. Reducing intestinal nematode infection: efficacy of albendazole and mebendazole. **Parasitology Today**, v.16, p.71-77, 2000.

BINA, J.C. Anti-helmínticos. IN: SILVA, P. **Farmacologia**, 5ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.1123-1136, 1998.

BUTTERWORTH, A.; DUNNE, D.; FULFORD, A. CAPRON, M.; KHALIFE, J.; CAPRON, A.; KOECH, D.; OUMA, J.; STURROCK, R. Immunity in human Schistosomiasis mansoni: cross-reactive IgM and IgG2 anti-carbohydrate antibodies block the expression of immunity. **Biochemie**, v.70, p.1053-1063, 1988.

CHAVES-BORGES, F.A.; MINEO, J.R. **Medidas de biossegurança em laboratórios**. Uberlândia: gráfica da Universidade Federal de Uberlândia, 55pp., 1997.

CHERTER, L.; CABEÇA, M. Parasitoses intestinais. **Revista Brasileira de Medicina**, v.57, p.212-216, 2000.

CHIEFFI, P.P.; GRYSCHKEK, R.C.B.; AMATO NETO, V. Diagnóstico e tratamento das parasitoses intestinais. **Revista Brasileira de Clínica e Terapêutica**, v. XXVI, 2000.

COOKSON, C. A powerful genetic punch: human molecules have much in common with the tiny fruit fly. **Financial Times**. IN: St JOHN, M.A.R.; XU, T. Insights from model systems – understanding human cancer in a fly? **American Journal of Human Genetics**, v.61, p.1006-1010, 1997.

CONFORTI-FROES, N.; EL-ZEIN, R.; AU, W. Genetic polymorphism and their contribution to cancer susceptibility. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 14, p.7-13, 1998.

COSTA, J.M. Teste imunoenzimático (ELISA) no diagnóstico da neurocisticercose. Estudo de diferentes extratos antigênicos na detecção de anticorpos IgG em amostras de soro e líquido cefalorraqueano. **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.44, p.15-31, 1986.

COSTA, J.M.; FERREIRA, A.W.; MAKINO, M.M.; CAMARGO, M.E. Spinal fluid immunoenzymatic assay (ELISA) for neurocysticercosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.24, p.337-341, 1982.

COSTA-CRUZ, J.M.; ROCHA, A.; SILVA, A.M.; MORAIS, A.T.; GUIMARÃES, A.H.B.; SALOMÃO, E.C.; ALCÂNTARA, T.M. Ocorrência de cisticercose em necropsias realizadas em Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, **Arquivos de Neuropsiquiatria**, v.53, p. 227-232, 1995.

CREBELLI, R.; CONTI, G.; CONTI, L.; CARERE, A. *In vitro* studies with nine known or suspected spindle poisons: results in tests for chromosome malsegregation in *Aspergillus nidulans*. **Mutagenesis**, v.6, p.131-136, 1991.

CUMMINGS, D.; NYAME A.K. Glycobiology of schistosomiasis. **The FASEB Journal**, v.10, p.838-848, 1996.

DAPKUS, D.; MERRELL, D.J. Chromosomal analysis of DDT-resistance in a long-term selected population of *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.87, p.685-697, 1977.

DAVIS, A.; DIXON, H.; PAWLOWSKI, Z.S. Multicentre clinical trials of benximidazole-carbamates in human cystic echinococcosis (phase 2). **Bulletim of the World Health Organization**, v.67, p.503-508, 1989.

DAYAN, A.D. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. **Acta Tropica**, v.86, p.141-159, 2003.

DEL BRUTTO, O. H. Neurocysticercosis. **Revista de Neurología**, v. 29, p. 456-466, 1999.

DEL BRUTTO, O.H.; DOLEZAL, M.; CASTILLO, P.R.; GARCIA, H.H. Neurocysticercosis and oncogenesis. **Archives of Medical Research**, v.31, p.151–155, 2000.

De La TORRE, R.A.; ESPINOSA-AGUIRRE, J.J.; NAVA, C.C.; IZQUIERDO, T.; MORON, F. Genotoxic activity of mebendazole in *Aspergillus nidulans*. **Mutation Research**, v.305, p.139-144, 1994.

DELATOUR, P.; LORGUE, G.; LAPRAS, M.; RICHARD, Y.C.R. Embryotoxic and antimitotic properties of parbendazole, mebendazole and cambendazole. **Academic Science Hebd Seances**, v.282, p.517-518, 1976.

DELESCLUSE, C.; LEDIRAC, N.; LI, R.; PIECHOCKI, M.P.; HINES, R.N.; GIDROL, X.; RAHMANI, R. Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells. **Biochemical Pharmacology**, v.61, p.399-407, 2001.

DOMINGUEZ, L.; FAGIOLINO, P.; GORDON, S.; MANTA, E. Bioavailability comparison between albendazole and albendazole sulfoxide in rats and man. **Farmaco**, v.50, p.697-702, 1995.

ELIZONDO, G.; GONSEBATT, M.E.; SALAZAR, A.M.; LARES, I.; SANTIAGO, P.; HERRERA, J.; HONG, E.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Genotoxic effects of metronidazole. **Mutation Research**, v.370, p.75-80, 1996.

ESCOBAR-IZQUIERDO, A. La patología de la neurocysticercosis, **Gaceta Medica de México**, v.124, p.202-206, 1988.

FACER, C.A.; PLAYFAIR, J.H.L. Malaria, Epstein-Barr virus and the genesis of lymphomas. **Advances Cancer Research**, v.53, p.33-33, 1989.

FLISSER, A.; GONZALEZ, D.; PLANCARTE, A.; OSTROSKY, P.; MONTERO, R.; STEPHANO, A.; CORREA, D. Praziquantel treatment of brain and muscle porcine *Taenia solium* cysticercosis. 2. Immunological and cytogenetic studies. **Parasitology Research**, v.76, p.640–642, 1990.

Flymove <http://flymove.uni-muenster.de/Homepage.html> (24-11-2004).

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F.E., Genotoxicity of ethyl carbamate in the *Drosophila* wing spot test: dependence on genotype-controlled metabolic capacity. **Mutation Research**, v. 244, p. 201-208, 1990.

FRÖLICH, A.; WÜRGLER, F.E., New tester strains with improved bioactivation capacity for the *Drosophila melanogaster* wing spot test. **Mutation Research**, v. 216, p.179-187, 1989.

FREI, H.; WÜRGLER, F.E. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. **Mutation Research**, v.203, p.308-397, 1988.

GENTILE, J.M.; DERUITER, E. Promutagen activation in parasite-infected organisms: preliminary observations with *Fasciola hepatica*-infected mice and aflatoxin B. **Toxicology Letters**, v.8, p.273–282, 1981.

GENTILE, J.M.; GENTILE, G.J.; NANNENGA, B.; JOHNSON, M.; BLANKESPOOR, H.; MONTERO, R. Enhanced liver cell mutations in trematode-infected Big Blue® transgenic mice. **Mutation Research**, v.400, p.355–360, 1998.

GOIN, C.J.; MAYER, V.W. Induction of chromosome loss in *Saccharomyces cerevisiae* strain D61.M by selected benzimidazole compounds. **Mutation Research**, v.343, p.185-199, 1995.

GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v.271, p.59-67, 1992.

GRAF, U.; SPANÓ, M.A.; GUZMÁN-RINCÓN, J.; ABRAHAM, S.K.; ANDRADE, H.H. The wing Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila melanogaster*: An efficient tool for the detection of genotoxic activity of pure compounds or complex mixtures as well as for studies on antigenotoxicity. **African Newsletter on Occupational Health and Safety**, v.6, p.9-13, 1996.

GRAF, U.; FREI, H.; KÄGI, A.; KATZ, A.J.; WÜRGLER, F.E. Thirty compounds tested in the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v.222, p.359-373, 1989.

GRAF, U.; WÜRGLER, F.E.; KATZ, A.J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C.B.; KALE, P.G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental and Mutagenesis**, v. 6, p. 153-188, 1984.

GRIFFITHS, A.J.F.; MILLER, J.H.; SUZUKI, D.T.; LEWONTIN, R.C.; GELBART, W.M. **Introdução à genética**. 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, pp.856, 1998.

GURRERA, P.M. Traditional antihelmintic, antiparasitic and repellent uses of plants in Central Italy. **Journal of Ethnopharmacology**, v.68, p.183-192, 1999.

GUSMÁN-RINCÓN, J.; GRAF, U. *Drosophila melanogaster* Somatic Mutation And Recombination Test as a biomonitor. IN: BUTTERWORTH, F.M. et al. (eds.) **Biomonitoring and biomarkers as indicators of environmental changes**. New York: Plenum Press, p.169-181, 1995.

HÄLLSTÖM, I.; BLANCK, A.; ATUMA, S. Genetic variation in cytochrome P-450 and xenobiotic metabolism in *Drosophila melanogaster*. **Biochemical Pharmacology**, v.33, p.13-20, 1984.

HASEMAN, J.K.; JOHNSON, F.M. Analysis of National Toxicology Program rodent bioassay data for anticarcinogenic effects. **Mutation Research**, v.350, p.131-141, 1996.

HASWELL-ELKINS, M.R.; SATARUG, S.; ELKINS, D.B. *Opisthorchis viverrini* infection in northeast Thailand and its relationship to cholangiocarcinoma. **Journal Gastroenterology and Hepatology**, v.7, p.538-548, 1992.

HAYASHI, K.; OHTSUKI, Y.; IKEHARA, I.; AKAGI, T.; MURAKAMI, M.; DATE, I.; BUKEO, T.; YAGYU, Y. Primary rhabdomyosarcoma combined with chronic paragonimiasis in the cerebrum: a necropsy case and review of the literature. **Acta Neuropathologica**, v.72, p.170-177, 1986.

HERRERA, L.A.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Do helminths play a role in carcinogenesis? **Trends in Parasitology**, v.17, p.172-175, 2001.

HERRERA, L.A.; TATO, P.; MOLINARI, J.L.; PÉREZ, E.; DOMÍNGUEZ, H.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Induction of DNA damage in human lymphocytes treated with a soluble factor secreted by *Taenia solium* metacestodes. **Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis**, Supplement 1, p.79–83, 2003.

HERRERA, L.A.; RODRÍGUEZ, U.; GEBHART, E.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Increased translocation frequency of chromosomes 7, 11 and 14 in lymphocytes from patients with neurocysticercosis. **Mutagenesis**, v.16, p.495–497, 2001.

HERRERA, L.A.; RAMÍREZ, T.; RODRÍGUEZ, U.; CORONA, T.; SOTELO, J.; LORENZO, M.; RAMOS, F.; VERDORFER, I.; GEBHART, E.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Possible association between *Taenia solium* cysticercosis and cancer. Increased frequency of DNA damage in peripheral lymphocytes from neurocysticercosis patients. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.94, p.61–65, 2000.

HERRERA, L.A.; BENITA-BORDES, A.; SOTELO, J.; CHÁVEZ, L.; OLVERA, J.; RASCÓN, A.; LÓPEZ, M.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Possible relationship between neurocysticercosis and hematological malignancies. **Archives of Medical Research**, v.30, p.154-158, 1999.

HERRERA, L.A.; SANTIAGO, P.; ROJAS, G.; SALAZAR, P.M.; TATO, P.; MOLINARI, J.L.; SCHIFFMANN, D.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Immune response impairment, genotoxicity and morphological transformation induced by *Taenia solium* metacestode. **Mutation Research**, v. 305, p.223-228, 1994.

HOBERG, E.P. *Taenia* tapeworms: their biology, evolution and socioeconomic significance. **Microbes and Infection**, v.4, p.859-866, 2002.

HONKAKOSKI, P.; NEGISHI, M. The structure, function and regulation of cytochrome P450 2A Enzymes. **Drugs Metabolism Reviews**, v.29, p.977-996, 1997.

HUDSON, A.T. Patent focus on antiparasitic agents: May-October 1999. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v.10. p.153-163, 2000.

ISHII, A.; MATSUOKA, H.; AJI, T.; HAYATSU, H.; WATAYA, Y.; ARIMOTO, S.; TOKUDA, H. Evaluation of the mutagenicity and the tumor-promoting activity of parasite extracts: *Schistosoma japonicum* and *Clonorchis sinensis* **Mutation Research**, v.224, p.229-233, 1989.

KATZ, A.J.; FOLEY, T.A. Effect of temperature on frequencies of spots in *Drosophila* wing-spot assay. **Environmental Molecular and Mutagenesis**, v.22, p.54-58, 1993

KONNO, K.; OKU, Y.; NONAKA, N.; KAMIYA, M. Hyperplasia of gastric mucosa in donor rats orally infected with *Taenia taeniaeformis* eggs and in recipient rats surgically implanted with the larvae in the abdominal cavity. **Parasitology Research**. v.85, p.431 –436, 1999.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F.F.A.C. Fármacos do tratogastrointestinal. IN: **Dicionário Terapêutico Guanabara**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, edição 2000/2001, p.10.15-10.16, 2001.

LACEY, E. The role of the cytoskeletal protein, tubulin in the mode of action and mechanism of drug resistance to benzimidazole. **International Journal for Parasitology**. v.18, 885-936, 1988.

LACLETTE, J.P.; SCHOEMAKER, C.B.; RICHTER, D.; ARCOS, L.; PANTE, N.; COHEN, C.; BING, D.; NICHOLSON-WELLER, A. Paramyosin inhibits complement C1. **Journal of Immunology**. v.148, p.124-128, 1992.

LANKAS, G.R.; NAKATSUKA, T.; BAN, Y.; KOMATSU, T.; MATSUMOTO, H. Developmental toxicity of orally administered thiabendazole in ICR mice. **Food and Chemical Toxicology**, v.39, p.367-374, 2001.

Le BRAS, J. Mechanisms and dynamics of *Plasmodium falciparum* drug-resistance. **Bulletin de La Société de Pathologie Exotique**, v.92, p.236-241, 1999.

LINO JÚNIOR, R.S., RIBEIRO, P.M., ANTONELLI, E.J., FALEIROS, A.C.G., TERRA, S.A., REIS, M.A., TEIXEIRA, V.P.A. Características evolutivas do *Cysticercus cellulosae* no encéfalo e no coração humanos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, p.617-622, 2002.

LOEB, K.R.; LOEB, L.A. Significance of multiple mutations in cancer. **Carcinogenesis**, v.21, p.379-385, 2000.

LIU, L.X.; WELLER, P.F. Strongyloidiasis and other intestinal nematode infections. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.37, p.655-682, 1993.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **Journal of Biological Chemistry**, v.29, p.265-275, 1951.

MAILHES, J.B.; YOUNG, D.; AARDEMA, M.J.; LONDON, S.N. Thiabendazole-induced cytogenetic abnormalities in mouse oocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.29, p.367-371, 1997.

MAILHES, J.B.; MARCHETTI, F. Chemically induced aneuploidy in mammalian oocytes **Mutation Research**, v.320, p.87-111, 1994.

MARRAZZINI, A.; BETTI, C.; BERNACCHI, F.; BARRAI, I.; BARALE, R. Micronucleus test and metaphase analyses in mice exposed to known and suspected spindle poisons. **Mutagenesis**, v.9, p.505-515, 1994.

MELO, S.M.A.; SPANÓ, M.A.; NEPOMUCENO, J.C. Ausência de efeitos genotóxicos do antibiótico amicacina em células de medula óssea de ratos Wistar, *in vivo*. **Revista do Centro de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia**, v.12, p.17-24, 1996.

MILLER, J.A.; MILLER, E .C. The metabolic activation and nucleic acid adducts of naturally-occurring carcinogens: recent results with ethyl carbamate and spice flavors safrole and estragole. **Brazilian Journal of Cancer**, v.48, p.1-15, 1983.

MIKLOS, G.L.; RUBIN, G.M. The role of the genome project in determining gene function: insights from model organism. **The Cell**, v. 86, p.521-529, 1996.

MONTERO, R.; FLISSER, A.; MADRAZO, I.; CUEVAS, C.; OSTROSKY-WEGMAN, P. Mutation at the HPRT locus in patients with neurocysticercosis treated with praziquantel. **Mutation Research**,v.305, p.181-188, 1994.

MONTERO, R.; OSTROSKY, P. Genotoxic activity of praziquantel. **Mutation Research**, v.387, p.123-139, 1997.

MONTERO, R.; GENTILE, G.J.; FREDERICK, L.; McMANNIS, J.; MURPHY, T.; SILVA, G.; BLANKESPOOR, H.; GENTILE, J.M. Induced expression of CYP2A5 in inflamed trematode-infested mouse liver. **Mutagenesis**, v.14, p.217–220, 1999.

NATARAJAN, A.T.; DUIVENVOORDEN, W.C.M.; MEIJERS, M.; ZWANENBURG, T.S.B. Induction of mitotic aneuploidy using Chinese hamster primary embryonic cells. Test results of 10 chemicals. **Mutation Research**, v.287, p.47-56, 1993.

OHSHIMA, H.; BARTSCH, H. Chronic infections and inflammatory processes as cancer risk factors: possible role of nitric oxide in carcinogenesis. **Mutation Research**, v.305, p.253–264, 1994.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, OFICINA SANITARIA PANAMERICANA, OFICINA REGIONAL DE LA ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Epidemiología y control de la teniasis-cisticercosis en America Latina**, OPAS, 1994, versión 3.0.

OUGH, C.S. Ethylcarbamate in fermented beverages and foods. I. Naturally occurring ethylcarbamate. **Journal of Agricola Food and Chemistry**, v.24, p.323-328, 1976.

PARKIN, D.M.; PARKIN, T.M.; PISANI, P.; FERLAY, J. The global health burden of infection associated cancers. **Cancer Survery**, v.33, p.5–33, 1999.

PICKERING, L.K. **Drugs for parasitic infections**. Report of the Committee on Infectious Diseases, 25 th ed. Elk Grove Village, 2000.

PITTELLA, J.E.H. Neurocysticercosis, **Brain Pathology**, v.4, p.681-693, 1997.

PFUETZENREITER, M.R.; ÁVILA-PIRES, F.D. Epidemiologia da teníase/cisticercose por *Taenia solium* e *Taenia saginata*. **Ciência Rural**, v.30, p.541-548, 2000.

POURGHOLAMI, M.H.; WOON, L.; ALMAJD, R.; AKHTER, J.; BOWERY, P.; MORRIS, D.L. *In vitro* and *in vivo* suppression of growth of hepatocellular carcinoma cells by albendazole. **Cancer Letters**, v. 165, p.43-49, 2001.

QUINTERO, G.; PRIETO, A.; CARIDAD, M.; PEROZO, M.; CUBILLAN, F.J.A. Efficacy of treatment with ivermectin 1%, on gastrintestinal nematodes in crossbred heifers. **Revista Científica Facultad de Ciências Veterinarias**, v.8, p.119-121, 1998.

RESTREBO, B.I.; AGUILAR, M.I; MELBY, P.C.; TEALE, J.M. Analysis of the peripheral immune response in patients with neurocysticercosis: evidence for T cell reactivity to parasite glycoprotein and vesicular fluid antigen. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, p.366-370, 2001.

REY, L. **Parasitologia**. 2^a ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 731pp., 2001.

GALTIER, P.; REY-GROBELLET, X.; EECKHOUTTE, C.; SUTRA, J.F.; ALVINERIE, M. Major involvement of rabbit liver cytochrome P4501A in thiabendazole 5-hydroxylation. **Xenobiotica**, v. 26, p.765-778, 1996.

RIBOVICH, M.L.; MILLER, J.A.; MILLER, E.C.; TIMMINS, L.G. Labeled 1, N,6-ethenoadenosine and 3, N,4-ethenocytidine in hepatic RNA of mice given [ethyl-1,2-3H] or [ethyl-1-14C] ethyl carbamate (urethane). **Carcinogenesis**, v.3, p.539-546, 1982.

RIDAURA-SÁNZ, C. Host response in childhood neurocysticercosis. Some pathological aspects. **Children Nervous System**, v.3, p.206-207, 1987.

RODRIGUES, J.C.V.; MELO, F.A.; MAGALHÃES, E.P.; RIBEIRO, S.B.F.; MARQUEZ, J.O. Interleukin-5 and interleukin-10 are major cytokines in cerebrospinal fluid from patients with active neurocysticercosis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.33, p.1059-1063, 2000.

ROSENTHAL, L.J.; PURTILO, D.T. Neoplasms associated with infectious agents. In: CONNOR, D.H.; CHANDIER, F.W.; SCHWARTZ, D.A.; MANZ, H.J.; LACK, E.E. eds. **Pathology of infectious diseases**, v. II. Stanford, CA: Appieton & Lange; 1996. p.1659.

ROSIN, M.P.; EL DIN ZAKI, S.S.; WARD, A.J.; ANWAR, W.A. Involvement of inflammatory reactions and elevated cell proliferation in the development of bladder cancer in schistosomiasis patients. **Mutation Research**, v.305, 283-292, 1994.

RYAN, P.; HURLEY, S.F.; JOHNSON, A.M. ROSIN, M.P. Tumors of the brain and presence of antibodies to *Toxoplasma gondii*. **International Journal Epidemiology**, v.22, p.412-413, 1993.

SBRANA, I.; DI SIBIO, A.; LOMI, A.; SCARCELLI, V. C-mitosis and numerical chromosome aberration analyses in human lymphocytes: 10 known or suspected spindle poisons. **Mutation Research**, v.287, p.57-70, 1993.

SHIGUEKAWA, K.Y.M.; MINEO, J.R.; MOURA, L.P.; COSTA-CRUZ, J.M. ELISA and Western Blotting tests in the detection of IgG antibodies to *Taenia solium* metacestodes in serum samples in human neurocysticercosis. **Tropical Medicine and International Health**, v.5, p.443-449, 2000.

SOTELO, J.; DEL BRUTTO, O.H. Brain cysticercosis, **Archives of Medical Research**, v.31, p.3-14, 2000.

SPANÓ, M.A.; FREI, H.; WÜRGLER, F.E.; GRAF, U. Recombinagenic activity of four compounds in the standard and high bioactivation crosses of *Drosophila melanogaster* in the wing spot test. **Mutagenesis**, v.16, p.385-394, 2001.

St JOHN, .M.A.R; XU, T. Insights from model systems – Understanding human cancer in a fly? **American Journal of Human Genetics**, v.61, p. 1006-1010, 1997.

TAKAYANAGUI, O.M.; LEITE, J.P. Neurocisticercose. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 34, p. 283-290, 2001.

TATO, P.; CASTRO, A.M.; RODRÍGUEZ, D.; SOTO, R.; ARECHAVALETA, F.; MOLINARI, J. Suppression of murine lymphocyte proliferation induced by a small RNA purified from the *Taenia solium* metacestode. **Parasitology Research**, v.81, p.181-187, 1995.

TOWNSEND, L.B.; WISE, D.S. The synthesis and chemistry of certain antihelmintic benzimidazoles. **Parasitology Today**, v.6, p.107-112, 1990.

TRACY, J.W.; WEBSTER JR, L.T. Fármacos usados no tratamento das parasitoses. IN: GOODMAN, G.; GILMAN, G. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 9º ed., Rio de Janeiro: Mcgraw-Hill Interamericana, 701pp., 1996.

TRICKER, A.R.; KUMAR, R.; SIDDIQUI, M.; KHUROO, M.S.; PREUSSMANN, R. Endogenous formation of N-nitrosamines from piperazine and their urinary-excretion following antihelminthic treatment with piperazine citrate. **Carcinogenesis**, v.12, p. 1595-1599, 1991.

TROSKO, J.E.; RUCH, R.J. Cell–cell communication in carcinogenesis. **Frontiers in Bioscience**, v.3, p.D208–D236, 1998.

VAN HUMMELEN, P.; KIRSCH-VOLDERS, M. Analysis of eight known or suspected aneugens by the *in vitro* human lymphocyte micronucleus test. **Mutagenesis**, v.7, p.447-455, 1992.

VELÍK, J., BALIHAROVÁ, V., FINK-GREMMELS, J., BULL, S., LAMKA, J., SKÁLOVÁ, L. Benzimidazole drugs and modulation of biotransformation enzymes. **Research in Veterinary Science**, v.76, p.95–108, 2004.

VIANNA, L.G., MACEDO, V., COSTA, J.M., MELLO, P., SOUZA, D. Estudo soroepidemiológico da cisticercose humana em Brasília, Distrito Federal. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.19, p.149-156, 1986.

VILLAGRÁN, J.; OLVERA, J.E. Cisticercosis humana, estudio clínico y parasitológico de 481 casos de autopsia. **Patologia**, v.26, p.149-150, 1988.

VOGEL, E.W. Genetical relationship between resistance to insecticides and procarcinogens in two *Drosophila* populations. **Archives Toxicological**, v.43, p.201-211, 1980.

VON BORSTEL, R.C.; HIGGINS, J.A. Janus carcinogens and mutagens. **Mutation Research**, v.402, p.321-329, 1998.

WARR, T.J.; PARRY, E.M.; PARRY, J.M. A comparison of two *in vitro* mammalian cell cytogenetic assays for the detection of mitotic aneuploidy using 10 known or suspected aneugens. **Mutation Research**, v.287, p.29-46, 1993.

WARREN, W.; BIGGS, P.J.; eL BAZ, M.; GHONEIM, M.A.; STRATTON, M.R.; VENITT, S. Mutations in the p53 gene in schistosomal bladder cancer: a study of 92 tumors from Egyptian patients and a comparison between mutational spectra from schistosomal and non-schistosomal urothelial tumors. **Carcinogenesis**, v.16, p.1181-1189, 1995.

WHO. **ATC Classification and DDD Assignment, fourth edition**. Oslo, WHO collaborating Centre for Drug Statistics Methodology. 2001.

WHO. **Report of the informal consultation on the use of chemotherapy for the control of morbidity due to soil-transmitted Nematodes in humans.** Geneva, World Health Organization, 1996.

WHO/IARC. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC **Monografia Evaluations Carcinogens of Risks Human**, v.61, p.261-265, 1994.

WHITE, A.C. Jr; TATO, P.; MOLINARI, J.L. Host-parasite interactions in *Taenia solium* cysticercosis. **Infectious Agents Diseases**, v.8, p.185–193, 1992.

WUHRER, M.; DENNIS, R.D.; DOENHOFF, M.J.; GEYER, R. Stage-associated expression of ceramide structures in glycosphingolipids from the human trematode parasite *Schistosoma mansoni*. **Biochemical et Biophysica Acta**, v.1524, p.155-161, 2000.