

# Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*

Frezza, T.F.<sup>1</sup>; Madi, R.R.<sup>1</sup>; Banin, T.M.<sup>1</sup>; Pinto, M.C.<sup>2</sup>; Souza, A.L.R.<sup>3</sup>; Gremião, M.P.D.<sup>3</sup>; Allegretti, S.M.<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

<sup>3</sup>Departamento de Fármacos e Medicamentos, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, UNESP, Araraquara, SP, Brasil.

Recebido 21/06/07 / Aceito 26/11/07

## RESUMO

A esquistossomose mansônica é causada pelo trematódeo digenético intravascular *Schistosoma mansoni*. Para o tratamento dessa enfermidade o praziquantel (PZQ) e a oxamniquina (OXA) são os fármacos escolhidos. No entanto, esses fármacos apresentam limitações quanto à ação e casos de resistência ou tolerância já foram relatados. Por esse motivo, são necessários os estudos de novas alternativas que visam melhorar os fármacos já existentes, como a incorporação desses em lipossomas. Este estudo verificou a ação do praziquantel incorporado a lipossomas (lip.PZQ) sobre os ovos de *S. mansoni*, linhagem BH em camundongos *Mus musculus* (Swiss-SPF). Para tanto, foram testadas quatro doses de PZQ e lip.PZQ (47; 60; 250 e 300mg/kg) sendo que parte dos camundongos foi tratada após 30 dias de infecção e outra após 45 dias. A análise do oograma mostrou que a dose lip.PZQ 300mg/kg administrada no 45º dia de infecção foi mais eficaz, pois reduziu a oviposição pelas fêmeas de *S. mansoni*.

**Palavras-chave:** *Schistosoma mansoni*; praziquantel; lipossoma; oograma.

## INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica é uma infecção parasitária causada pelo trematódeo digenético intravascular *Schistosoma mansoni* (Blanchard et al., 1993). Essa infecção tem nos granulomas que se formam ao redor dos ovos do parasito no fígado e em outros órgãos do hospedeiro, a principal causa dos sinais da doença, podendo ocorrer nos casos mais graves, hepatoesplenomegalia, fibrose do fígado, hipertensão portal, ascite e morte em decorrência dessas complicações (Wahl et al., 1997).

A quimioterapia contra a esquistossomose teve

início com a introdução de antimoniais, como o tártaro emético (Christopherson, 1918), que apresentava efeitos colaterais tóxicos, o que levou a pesquisa de outros fármacos ativos, livres de metal e administrados via oral. A partir de então, surgiram novos fármacos como a lucanthona (Kikuth & Gönnert, 1948) e o niridazol (Lambert, 1964) que atuavam contra as três principais espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, o *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*. No entanto, esses fármacos, por apresentarem graves efeitos colaterais, não foram considerados seguros o suficiente para serem utilizados em larga escala nas regiões endêmicas.

Em 1969, Richards & Foster descreveram a oxamniquina (OXA) e em 1977, Thomas & Gönnert e Gönnert & Andrews descreveram a atividade do praziquantel (PZQ) contra cestódeos e trematódeos. Atualmente a OXA e o PZQ são os fármacos escolhidos para o tratamento das esquistossomoses, sendo o primeiro ativo somente para a esquistossomose mansônica. Contudo, tanto o PZQ quanto a OXA apresentam limitações como baixa eficácia no tratamento da esquistossomose mansônica aguda, baixa atividade sobre o *S. mansoni* na forma imatura e falha em tratamentos devido à ocorrência de resistência ou tolerância a esses fármacos (Frézard & Melo, 1997). Por outro lado, a indústria farmacêutica, detentora do registro de produtos contendo OXA, decidiu limitar a produção de medicamentos com esse fármaco, tornando-se o PZQ a única forma de tratar esta parasitose (Mourão, 2001).

O PZQ, porém, é um fármaco de uso oral que apresenta baixa biodisponibilidade devido a sua alta lipossolubilidade (Mourão et al., 2005). Outro fator que compromete a eficácia do tratamento com esse fármaco está relacionado com sua baixa efetividade contra as formas mais jovens do parasito. Esses efeitos, entretanto, não estão totalmente elucidados.

Recentemente, foi demonstrado que a incorporação do PZQ em lipossomas melhorou sua solubilidade em

\*Autor correspondente: Silmara Marques Allegretti - Departamento de Parasitologia - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP - Cidade Universitária "Zeferino Vaz", s/nº. - Caixa Postal 6109 - CEP: 13083-970 - Campinas - SP, Brasil - Telefone: (19) 3521-6286 - e-mail: sallegre@unicamp.br

sistemas aquosos sem, contudo, alterar sua eficácia *in vitro* contra a linhagem LE de *S. mansoni* (Mourão, 2001; Cinto, 2005). Sistemas nanoestruturados, como lipossomas, por possuírem a capacidade de compartimentalizar de maneira eficiente diversos grupos de agentes terapêuticos e modificar as propriedades e o comportamento de substâncias ativas em meio biológico, podem alterar a farmacocinética, aumentar a solubilidade de fármacos lipofílicos, reduzir a distribuição inespecífica, aumentar a distribuição para tecidos alvos e, conseqüentemente aumentar a eficácia (Mourão, 2001; Cinto, 2005). Em estudos *in vivo*, esses mesmos autores verificaram que lipossomas de fosfatidilcolina (PC) contendo PZQ foram mais efetivos que o fármaco disperso apenas em presença de tampão Tris pH 7,5, obtendo-se redução significativa do número de ovos e vermes de *S. mansoni* LE em camundongos Balb-c (Mourão et al. 2005). Entretanto, o efeito desse sistema nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasito não foi avaliado neste trabalho.

Apesar do sucesso no emprego do fármaco e deste ser amplamente estudado, são poucos os estudos que investigam como a compartimentalização do fármaco numa determinada estrutura, neste caso lipossomas, pode modificar a resposta farmacológica do fármaco, uma vez que o ambiente restrito em que esta substância encontra-se pode modificar sua solubilidade em meio aquoso ou ainda sua interação com o alvo.

No caso específico da esquistossomose, que apresenta um ciclo bastante complexo, conhecer como esses sistemas podem modificar a resposta farmacológica do fármaco é importante para definir a melhor estratégia para o desenvolvimento de novos medicamentos.

Nesse contexto, este estudo avaliou o efeito do PZQ incorporado em lipossomas (lip.PZQ) no *S. mansoni*, linhagem BH. Para tanto verificou-se a alteração da quantidade de ovos liberados no intestino de camundongos *Mus musculus* (Swiss-SPF), em seus diferentes estágios de desenvolvimento.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Linhagem do *Schistosoma mansoni*

A linhagem de *S. mansoni* utilizada foi a BH (oriunda de Belo Horizonte, MG), mantida no Departamento de Parasitologia do Instituto de Biologia da Unicamp em moluscos planorbídeos *Biomphalaria glabrata* (Paraense & Corrêa, 1963).

### Infecção do Hospedeiro Intermediário

Os moluscos planorbídeos da espécie *B. glabrata* foram mantidos conforme proposto por Pellegrino & Katz (1968), até que atingissem o tamanho ideal para poderem

ser infectados (6 a 10mm de diâmetro) (Frezza, 2007).

Para infecção dos hospedeiros intermediários foram utilizados dez miracídios, obtidos das fezes de camundongos infectados há 45 dias (esses camundongos foram utilizados apenas para infectar os hospedeiros intermediários). Para cada ciclo de infecção foram expostos 80 moluscos, para que fornecessem uma quantidade razoável de indivíduos positivos a fim de se obter equilíbrio entre os sexos do parasito (Pellegrino & Katz, 1968).

Decorridos 35 a 40 dias de infecção dos hospedeiros intermediários, os moluscos foram expostos à luz e à temperatura de 28°C para eliminação de cercárias (Stirewalt, 1954). Essas foram recolhidas em tubos de ensaio, contendo 70 cercárias cada (Frezza, 2007).

### Hospedeiro Definitivo

Os camundongos (*Mus musculus*) utilizados foram da linhagem Swiss-SPF, fêmeas, com 30 dias de idade (Pellegrino & Katz, 1968; Martinez et al., 2003), fornecidas pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB) da Unicamp. Os camundongos foram mantidos em caixas plásticas com tampas metálicas e alimentados com ração de animal de laboratório e água "ad libitum". No manejo, os animais recebiam maravalha autoclavada, em três trocas semanais (Bonesso-Sabadini, 1995; Frezza, 2007).

### Infecção do Hospedeiro Definitivo

As cercárias eliminadas pelos hospedeiros intermediários foram utilizadas na infecção do hospedeiro definitivo. Os camundongos foram infectados individualmente com 70 cercárias. A infecção foi feita por meio da imersão caudal em suspensão cercariana, durante duas horas com exposição à luz e temperatura de 28°C (Olivier & Stirewalt, 1952).

### Tratamento

Os camundongos foram divididos em dois grandes grupos. Um deles recebeu tratamento após 30 dias de infecção (para testar a ação nos vermes adultos jovens) e o outro após 45 dias (para testar a ação nos vermes adultos) (Barth et al., 1996; El-Ridi et al., 1997; Martinez et al, 2003).

Cada grupo de camundongo continha 30 animais. Dez deles receberam uma determinada dose de praziquantel disperso em Tampão Tris 20 mM pH 7,5 (PZQ-livre) a ser testada; outros dez animais receberam as mesmas dosagens de PZQ, dessa vez incorporada em lipossomas de fosfatidilcolina (lip.PZQ); os dez restantes receberam solução Tampão Tris/HCl 20 mM pH 7,5 (grupo controle), existindo um grupo controle para cada dose testada. O tratamento foi feito via oral por meio de tubagem esofágica (Delgado et al., 1992).

Foram testadas quatro diferentes doses de PZQ,

incorporado ou não em lipossomas: 47; 60; 250 e 300mg/kg. Os lipossomas de fosfatidilcolina foram preparados através do método da sonicação, conforme descrito por Mourão et al. (2005).

### Análise do Tratamento

Após 15 dias da administração do tratamento (Delgado et al., 1992), os animais foram sacrificados por meio do deslocamento cervical (Martinez et al., 2003). Foram retirados fragmentos de 1cm do intestino delgado de cada camundongo para leitura do oograma, onde foram contados os ovos nos seus diferentes estágios de desenvolvimento e ovos mortos (Pellegrino et al., 1962). A classificação dos estágios seguiu o critério proposto por Pellegrino et al. (1962). Foram analisados dez campos aleatórios no microscópio óptico com aumento de 100 vezes.

### Análises Estatísticas

As porcentagens de eficiência foram calculadas conforme proposto por Delgado et al. (1992), por meio da seguinte fórmula: % de Eficiência = (Grupo Controle Positivo-Grupo Tratado/Grupo Controle Positivo) x100. As análises estatísticas foram feitas com auxílio do programa SAS (SAS Inc, 1996) e para tanto, foi utilizada a Análise da Variância e o Teste de Comparação Múltipla de Médias de Duncan, considerando estatisticamente significativos os valores comparados em nível de significância de  $p \leq 0,05$  (Pimentel-Gomes, 2000).

## RESULTADOS

Os oogramas dos grupos controles referentes a todas as doses, apresentaram na grande maioria, quantidades maiores de ovos imaturos (ou seja, do 1º ao 4º estágios de desenvolvimento) do que de ovos maduros (5º estágio de desenvolvimento), indicando que a oviposição, para este grupo, ocorreu até a época da análise. O mesmo ocorreu com o grupo tratado com PZQ-livre e com lip.PZQ, exceto para a dose lip.PZQ 300mg/kg (45º dia). Dessa maneira, a dose lip.PZQ 300mg/kg, mostrou-se mais eficaz em relação às outras já que houve diminuição na quantidade dos ovos imaturos e também maduros em ambos os dias de tratamento. Por outro lado, a quantidade de ovos imaturos no grupo tratado aos 45 dias de infecção foi menor que a de ovos maduros.

Analisando cada dose separadamente, foi possível observar que os tratamentos feitos no 30º dia de infecção mostraram diminuição na quantidade de ovos maduros para os grupos de camundongos tratados com PZQ-livre 60 e 250mg/kg, enquanto que os tratados com lip.PZQ a eficiência foi maior com a dose de 300mg/kg (98% de eficiência).

Houve redução no número de ovos imaturos quando os animais foram tratados com a dose 300mg/kg de lip.PZQ após 30 dias de infecção (Tabela 1). Os tratamentos feitos com PZQ-livre 47, lip.PZQ 250 e lip.PZQ 300mg/kg no 45º dia de infecção diminuíram a quantidade de ovos imaturos. Para os ovos maduros, a dose 300mg/kg de lip.PZQ mostrou-se mais efetiva com menor quantidade de ovos nesse estágio (Tabela 2).

Tabela 1 - Efeito das doses de Praziquantel livre (PZQ-livre) e incorporada em lipossomas (lip.PZQ) sobre os ovos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento aos 30 dias de infecção.

30 dias	Medicamento	OOGRAMA			
		Dose (mg/kg)	IMAT $\bar{X}$	MAD $\bar{X}$	MORTOS $\bar{X}$
47	CON	16,6	4,6	2,6	-
	PZQ	12,7	6,7	2,7	-
	lip.PZQ	5,8	4	2,9	-
60	CON	30,9	15,1	3,1	-
	PZQ	18,1	3,1*	2,9	24
	lip.PZQ	17,3	8,5	1,5	55
250	CON	25,1	14,1	0,5	-
	PZQ	15,5	3*	1,1	78
	lip.PZQ	16,7	5,9	2,5	99
300	CON	25,1	14,1	0,5	-
	PZQ	24,7	5	4	66
	lip.PZQ	5,8*	0,9*	1,7	98

IMAT - Ovos imaturos. MAD - Ovos maduros. MORTOS - Ovos Mortos. CON - Grupo Controle Positivo.  $\bar{X}$  - Média. \* $p \leq 0,05$ .

### Efeito do PZQ+lipossomas em ovos de *S. mansoni*

Tabela 2 - Efeito das doses de Praziquantel livre (PZQ-livre) e incorporada em lipossomas (lip.PZQ) sobre os ovos de *Schistosoma mansoni*. Tratamento aos 45 dias de infecção.

45 dias	Medicamento	OOGRAMA			
		IMAT $\bar{X}$	MAD $\bar{X}$	MORTOS $\bar{X}$	% de Eficiência
47	CON	29,1	14	1,8	-
	PZQ	12,9*	7,1	4,7	-
	lip.PZQ	31,5	11,6	2,2	-
60	CON	20,9	21,1	0,5	-
	PZQ	21,6	20,3	1,3	16,7
	lip.PZQ	25	17,7	1,5	55,1
250	CON	21,7	15,28	2,9	-
	PZQ	18,8	14,68	3,6	17,7
	lip.PZQ	8,58*	4,5	2,2	89,2
300	CON	25,8	17,1	2,6	-
	PZQ	10,5	8,8	5,8	22,7
	lip.PZQ	3,1*	5*	1,9	98

IMAT - Ovos imaturos. MAD - Ovos maduros. MORTOS - Ovos Mortos.  
CON - Grupo Controle Positivo.  $\bar{X}$  - Média. \* $p \leq 0,05$ .

## DISCUSSÃO

Os ovos de *S. mansoni* no intestino levam de seis a sete dias para desenvolverem-se completamente, ou seja, passar do primeiro estágio para o quinto, quando há formação de um miracídio (ovo maduro). Os ovos maduros permanecem viáveis no intestino por cerca de doze dias (Prata, 1957), portanto, se a oviposição diminuir com a administração do fármaco, o oograma deverá apresentar maior quantidade de ovos maduros, em decorrência de oviposições anteriores ao tratamento, que de ovos imaturos. Assim ocorreu no tratamento feito com 300mg/kg de lip.PZQ no 45º dia de infecção. Isso mostra que a oviposição foi menor, já que ovos recentes (nos primeiros estágios) foram encontrados em menor quantidade em relação aos ovos maduros, indicando que essa dose, quando administrada nesse dia, é mais eficiente na redução da oviposição em relação às outras testadas e nos outros dias de administração.

Apesar de 300mg/kg ser uma dose muito alta, o fato observado é muito importante já que conforme as observações de Richards et al. (1989) sobre o efeito do PZQ contra os ovos de *S. mansoni*, este fármaco atua apenas nos ovos maduros, matando-os, e os imaturos continuam se desenvolvendo até serem eliminados. Além disso, não foram observados efeitos colaterais nos camundongos que receberam esse tratamento.

O método utilizado para avaliar a ação dos fármacos testados (método do oograma) é seguro, pois segundo Hill et al. (1966), Pellegrino & Katz (1968) e Monteiro et al.

(1968), considerando que a administração de agentes esquistosomicidas produz temporária ou definitivamente a suspensão da postura dos ovos, a obtenção de informações como a diminuição, a cessação completa da oviposição nos animais tratados ou alterações no oograma (como mudança no número de ovos em diferentes estágios) podem ser usados para avaliar a atividade terapêutica do agente ou de um fármaco em teste. De acordo com Cunha (1992), o oograma consiste no método mais fidedigno para avaliar a eficácia terapêutica dos fármacos na esquistossomose mansônica.

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Capes pelo suporte financeiro.

## ABSTRACT

*Effect of praziquantel in liposomes on Schistosoma mansoni eggs at different development stages*

**Mansonian schistosomiasis is caused by an intravascular digenetic trematode *Schistosoma mansoni*. Praziquantel (PZQ) and oxamniquine (OXA) are the drugs of choice for the treatment of this disease. However, both drugs are subject to some limitations in their action and cases of tolerance and resistance have been reported. Moreover, tolerance and resistance cases have been reported. For**

**this reason, there is an urgent need for research on new alternatives aimed at improving the action of existing drugs, such as the incorporation of these drugs into liposomes. In this study, the efficiency of action of liposome-encapsulated praziquantel (lip.PZQ) on oviposition by *S. mansoni*, strain BH, was assessed in *Mus musculus* mice (SPF Swiss mice). Four PZQ and lip.PZQ doses (47; 60; 250 e 300mg/kg) were tested. Some mice were treated 30 days post-infection and others after 45 days. The oogram analyses showed that the most effective lip.PZQ treatment was 300mg/kg dose given on the 45<sup>th</sup> day post infection, which reduced the number of *S. mansoni* eggs per gram of tissue.**

**Keywords:** *Schistosoma mansoni*; praziquantel; liposome; oogram.

## REFERÊNCIAS

- Barth LR, Fernandes AP, Rodrigues V. Oviposition by *Schistosoma mansoni* during in vitro cultivation. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1996; 38:423-6.
- Blanchard TJ, Milne LM, Pollock R, Coock GC. Early chemotherapy of imported neuroschistosomiasis. *Lancet* 1993; 341(8850):959.
- Bonesso-Sabadini PIP. *Avaliação da suscetibilidade da linhagem Ouh (Ourinhos, Vale do Paranapanema - SP) de Schistosoma mansoni ao oxamniquine e praziquantel* [Dissertação] Campinas: Instituto de Biologia, UNICAMP, 1995.
- Christopherson JB. The successful use of antimony in bilhaziasis. *Lancet* 1918; 2:325-7.
- Cinto PO. *Avaliação da absorção intestinal de praziquantel veiculado em lipossomas*. [Dissertação] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP. 2005.
- Cunha AS. Schistosomiasis mansoni - drug therapeutic. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1992; 87 (Suppl 4):341-51.
- Delgado VS, Suárez DP, Cesari IM, Hincan RN. Experimental chemotherapy of *Schistosoma mansoni* with praziquantel and oxamniquine: differential effect of single or combined formulations of drugs on various strains on both sexes of the parasite. *Parasitol Res* 1992; 78:648-54.
- El-Ridi R, Ozaki T, Inaba T, Ito M, Kamiya M. *Schistosoma mansoni* oviposition in vitro reflects worm fecundity in vivo: individual, parasite age and host dependent variations. *Int J Parasitol* 1997; 27:381-7.
- Frézard F, Melo AL. Evaluation of the schistocidal efficacy of liposome-entrapped oxamniquine. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1997; 39(2):91-100.
- Frezza TF. *Avaliação do efeito do praziquantel associado a lipossomas em Schistosoma mansoni in vivo* [Dissertação] Campinas: Instituto de Biologia, UNICAMP, 2007.
- Gönnert R, Andrews, P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. *Z Parasitenkd* 1977; 52:129-50.
- Hill J, Rust MA, Pellegrino J, Faria J. Use of the oogram to reveal the effect of a nitrofurylacrylamide on the eggs of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 1966; 52:822.
- Kikuth E, Gönnert R. Experimental studies on the therapy of schistosomiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1948; 42:256-67.
- Lambert CR. Chemotherapy of experimental *Schistosoma mansoni* infection with a nitro-thiazole derivative, CIBA 32,644-Ba. *Ann Trop Med Parasitol* 1964; 58:293-303.
- Martinez EM, Neves RH, Oliveira RMF, Machado-Silva JR, Rey L. Características biológicas e morfológicas de cepas brasileiras de *Schistosoma mansoni* em *Mus musculus*. *Rev Soc Bras Med Trop* 2003; 36(5):557-64.
- Monteiro W, Pellegrino J, Silva MLH. Unusual oogram pattern in mice after niridazole treatment. *J Parasitol* 1968; 54:175-6.
- Mourão, SC. *Preparação e caracterização de lipossomas contendo praziquantel*. [Dissertação] Araraquara: Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP; 2001.
- Mourão SC, Costa PI, Salgado HRN, Gremião MPD. Improvement of antischistosomal activity of praziquantel by incorporation into phosphatidylcholine-containing liposomes. *Int J Pharm* 2005; 295:157-62.
- Olivier L, Stirewalt MA. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 1952; 38:19-23.
- Paraense WL, Corrêa LR. Variation in susceptibility of populations of *Australorbis glabratus* to strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1963; 5:15-22.
- Pellegrino J, Oliveira CA, Faria J, Cunha AS. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. *Am J Trop Med Hyg* 1962; 11:201-15.
- Pellegrino J, Katz N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. *Adv Parasitol* 1968; 6:233-90.
- Pimentel-Gomes F. *Curso de estatística experimental*. 14.ed. Piracicaba: USP/ESALQ; 2000. 477p.
- Prata A. Tipos de ovos de *Schistosoma mansoni*. In: *Biópsia retal na esquistossomose mansoni: bases e aplicações no diagnóstico e tratamento*. Rio de Janeiro: Serviço Nacional de Educação Sanitária; 1957. p.15-60.
- Richards HC, Foster R. A new series of 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivatives displaying schistocidal activity in rodents and primates. *Nature* 1969; 222:581-2.
- Richards F, Sullivan J, Ruiz-Tiben E, Eberhard M, Bishop H. Effect of praziquantel on the eggs of *Schistosoma mansoni*, with a note on the implications for managing central nervous system schistosomiasis. *Ann Trop Med Parasitol* 1989; 83(5):465-72.

*Efeito do PZQ+lipossomas em ovos de S. mansoni*

SAS Institute Incorporation. *SAS user's guide: statistics* release 6.12. North Caroline: Cory; 1996. 1098p.

Stirewalt MA. Effect of snail maintenance temperatures on development of *Schistosoma mansoni*. *Exp Parasitol* 1954; 3:504-16.

Thomas H, Gönner R. The efficacy of praziquantel against cestodes in animals. *Z Parasitenkd* 1977; 52:117-27.

Wahl SM, Frazier-Jessen M, Jin WW, Kopp JB, Sher A, Cheever AW. Cytokine regulation of schistosome-induced granuloma and fibrosi. *Kidney Int* 1997; 5:1370-5.