

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

THIAGO JOSÉ MATOS ROCHA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE
NOVOS DERIVADOS TIOXO-IMIDAZOLIDÍNICOS EM
VERMES ADULTOS DE *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907)**

RECIFE

2016

THIAGO JOSÉ MATOS ROCHA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE
NOVOS DERIVADOS TIOXO-IMIDAZOLIDÍNICOS EM
VERMES ADULTOS DE *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907)**

**Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Inovação Terapêutica da
Universidade Federal de Pernambuco, para a
obtenção do Título de Doutor em Inovação
Terapêutica.**

Orientadora:

Profa. Dra. Máira Galdino da Rocha Pitta – LINAT/UFPE

Coorientadores:

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves - CPqAM/FIOCRUZ/PE

Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima- LPSF/UFPE

RECIFE

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Rocha, Thiago José Matos

Avaliação da atividade esquistossomicida de novos derivados tioxiimidazolidínicos em vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Sambon,1907) / Thiago José Matos Rocha – Recife: O Autor, 2016.

140 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Máira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadores: Luiz Carlos Alves e Maria do Carmo Alves de Lima

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Inovação Terapêutica, 2016.

Inclui referências e anexos

- 1. Anti-helmínticos 2. *Schistosoma mansoni* 3. Esquistossomose I. Pitta, Máira Galdino da Rocha (orientadora) II. Alves, Luiz Carlos (coorientador) III. Lima, Maria do Carmo Alves de (coorientadora) IV. Título**

615.1

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-099

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica

REITOR

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETORA DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Prof^ª. Dr^ª. Maria Eduarda Lacerda de Larrazabal

VICE- DIRETORA DO CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

Prof^ª. Dr^ª. Oliane Maria Correia Magalhães

COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof^ª. Dr^ª. Maíra Galdino da Rocha Pitta

VICE- COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

Prof. Dr. Luiz Alberto Lira Soares



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

Recife, 05 de fevereiro de 2016.

Tese de Doutorado defendida e **APROVADA**, por decisão unânime, em 05 de fevereiro de 2016, cuja Banca Examinadora foi constituída pelos seguintes professores:

PRESIDENTE E PRIMEIRA EXAMINADORA INTERNA: Prof^a. Dr^a. Maira Galdino da Rocha Pitta (Departamento de Bioquímica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR INTERNO: Prof. Dr. Claudio Gabriel Rodrigues
(Departamento de Biofísica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

PRIMEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Prof^a. Dr^a. Mariana Aragão Matos Donato
(Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães)

Assinatura: _____

SEGUNDO EXAMINADOR EXTERNO: Prof. Dr. Artur Felipe Santos Barbosa
(Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica – Universidade Federal de Pernambuco)

Assinatura: _____

TERCEIRA EXAMINADORA EXTERNA: Prof^a. Dr^a. Flaviana Santos Wanderley
(Departamento de Medicina – Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas)

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais Gilberto Alves Rocha e Lúcia Maria Matos Rocha, que com ato de adoção me proporcionaram uma vida digna e honesta pela qual prezo com todo amor e carinho.
Exemplos de vida!*

As minhas irmãs Priscilla e Aninha pelo companheirismo, amizade, convivência e alegria que sempre é compartilhada quando nos encontramos.

Aos meus sobrinhos Marlisson e Nickholas.

Aos meus primos Juliana, Jaqueline, Gustavo e Júnior.

Aos meus tios Josias, Lúcia, Gildete e Nivaldo.

A Eliete e Edson Neto.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus por ter me dado vida, ser constantemente presente em minha vida, por me guiar dia-a-dia, por ter me dado capacidade de acreditar em mim, pelas vitórias conseguidas e por fazer de mim uma pessoa cada vez melhor.

A Profa. Dra. Suely Lins Galdino, *in memorian*, pelos conselhos que sempre me foi dado, pelos bons momentos ao seu lado e por ter me aceito de braços abertos como aluno de doutorado.

A minha orientadora Profa. Dra. Máira Galdino da Rocha Pitta, pesquisadora do Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, pela oportunidade e confiança no desenvolvimento desse trabalho que foi construído e desenvolvido ao longo desses anos.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Alves e Prof. Dr. Fábio André Brayner, pesquisadores do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz, por estarem ao meu lado há tanto tempo, afinal foram meus orientadores de Mestrado. Agradeço a Deus por colocar pessoas como vocês, tão importantes na minha trajetória que me abriram muitas oportunidades, manifesto minha profunda e eterna gratidão. Nossa amizade ficará registrada pelas importantes experiências de crescimento, amadurecimento e aprendizado, acrescidas, sem dúvida, por momentos de descontração no dia-a-dia desses anos em que atuamos juntos.

A Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima, do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, pelo exemplo de pesquisadora, e acima de disso, ter esse espírito de mãe e amiga para com os alunos que fazem parte do seu grupo de pesquisa, que para mim particularmente faz toda diferença na construção dessa caminhada no seguimento da pesquisa científica.

Ao Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF/UFPE), em especial ao Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta, Profa. Dra. Maria do Carmo e Profa. Marina da Rocha Pitta pela caracterização química dos compostos sintetizados e por fim, a Vinícius Barros Ribeiro

da Silva e Rofolfo Lucas Moreira dos Santos, pela síntese das tioxo-imidazolidinas utilizadas nesse estudo.

Aos meus amigos eternos que ganhei durante o período que passei em Recife-PE, Anekécia Lauro e Antônio Sergio, pela amizade, companheirismo, incentivo e momentos agradáveis vividos sempre que nos encontramos e pelos momentos de correria durante a realização dos ensaios biológicos. Vocês estarão sempre no meu coração.

A todos que fazem parte do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM-FIOCRUZ/PE), Ana Paula, Alisson, Alberon, Camila, Eduarda, Carmelita, Catarina, Dyana, Elverson, Fernanda, Gabriel, Jeferson, Marília e Nayron.

A todos que fazem parte do Laboratório de Imunomodulação e Novas abordagens Terapêuticas (LINAT/UFPE), em especial, Mardonny e Pablo, pela ajuda com os ensaios biológicos de viabilidade celular.

Ao Rafael Padilha do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, pela ajuda com processamento do material para análise de microscopia eletrônica de varredura.

Aos amigos PPGITEanos Luana Mariz, Bruno Trajano, Renato Ferreira, Jéssica Barbosa, Marlene Saraiva, João Luiz, Isabella Araújo, Jamilka Silva pelo companheirismo, estudos e pela grande amizade construída.

Aos amigos que sempre estiveram presente apoiando, consolando, discutindo e compartilhando ideais, fizeram com que minha estadia em Recife fosse uma maravilha, e que contribuíram direta ou indiretamente ao meu crescimento pessoal, dentro ou fora da universidade, em especial e, Armando, Emmily, Gabriela, Marcelle e Rodrigo, agradeço a todos!

A Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT) pela oportunidade.

Ao Paulo Germano Moreira de Brito, Secretário do Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, sempre atencioso, por toda ajuda que me foi dado durante todo o doutorado.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa de pós-graduação.

Gostaria também de agradecer a banca examinadora: Profa. Dra. Flaviana Santos Wanderley, Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues, Prof. Dr. Artur Felipe Santos Barbosa e a Profa. Dra. Mariana Aragão Matos Donato que cedeu uma parte de seu tempo precioso para poder contribuir com meu trabalho.

A todos aqueles que conviveram comigo nestes quatro anos, não mencionados que, de alguma maneira, contribuíram em mais uma etapa em minha carreira profissional.

Sou imensamente feliz por todas as pessoas que conheci e convivi, e principalmente pelas amizades que construí! A todas as pessoas que passaram nessa jornada da minha vida eu deixo aqui gravado uma letra que gosto muito e diz o seguinte:

*Quem me dará um ombro amigo / Quando eu precisar?
E se eu cair, se eu vacilar / Quem vai me levantar?
Sou eu quem vai você ouvir / Quando o mundo não puder te entender
Foi Deus quem te escolheu pra ser / O melhor amigo que eu pudesse ter
Amigos para sempre / Bons amigos que nasceram pela fê
Amigos para sempre / Para sempre se Deus quiser
Quem é que vai me escolher / Na minha indecisão
Se eu me perder pelo caminho / Quem me dará a mão
Foi Deus quem consagrou você e eu / Para sermos bons amigos num só coração
Por isso eu estarei aqui / Quando tudo parecer sem solução
Peço a Deus que te guarde / E te dê tua paz....*

*“Acredite é hora de vencer
Essa força vem de dentro de você
Você pode até o céu se crer
Acredite que nenhum de nós
Já nasceu com jeito de super herói
Nossos sonhos a gente é quem constrói
É vencendo os limites escalando as fortalezas
Conquistando o impossível pela fé
Campeão vencedor Deus dá asas faz teu voo
Campeão vencedor essa fé que te faz imbatível
Te mostra o teu valor...
Acredite que nenhum de nós
Já nasceu com jeito de super herói.”*

RESUMO

ROCHA, T. J. M.: Avaliação da atividade esquistossomicida de novos derivados tioxo-imidazolidínicos em vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). 2016. 140f. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

A esquistossomose mansoni é uma parasitose grave causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*. A justificativa para novas alternativas terapêuticas está pautada no fato de que no Brasil, atualmente, praziquantel é o único medicamento empregado para tratamento da esquistossomose, mas seu extensivo uso inevitavelmente culminou em baixas taxas de cura, aparecimento de isolados de *Schistosoma mansoni* refratários, além de terem sido observados efeitos adversos causados por esse medicamento. Assim, torna-se relevante a busca por novas moléculas esquistossomicidas e, nesse contexto, pesquisas com compostos sintéticos consistem numa alternativa viável. As imidazolidinas são representadas por um grupo de substâncias heterocíclicas pentagonais possuidoras de diversas atividades biológicas, inclusive atividade esquistossomicida. Neste sentido, esse trabalho teve como objetivo investigar a atividade esquistossomicida de novos derivados tioxo-imidazolidínicos. As moléculas sintetizadas foram caracterizadas através de métodos espectroscópicos no infravermelho e ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono. Casais de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* foram obtidos por perfusão do sistema porta-hepático e mantidos em cultura no meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina (100U/mL) e estreptomicina (100µg/mL). As culturas foram mantidas a 37°C com atmosfera de 5% CO₂, e, após 2 horas de adaptação ao meio de cultura, foram adicionados os derivados tioxo-imidazolidínicos. Os parasitos foram mantidos durante cinco dias sendo monitorados a cada 24 horas para avaliação da motilidade, oviposição, acasalamento e mortalidade. Por fim, foi avaliada a ação de LPSF/PTS23 sobre o tegumento dos vermes recuperados nos testes *in vitro* por microscopia eletrônica de varredura. Os compostos LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18, LPSF/PTS19 demonstraram citotoxicidade quando avaliadas (até uma concentração de 10µM) sobre Células Mononucleares de Sangue Periférico, já os derivados LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS10, LPSF/PTS23 e LPSF/PTS24 se apresentaram atóxicos até 100 µM. Na atividade esquistossomicida os compostos LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS10 e LPSF/PTS23 foram os mais ativos, sendo que LPSF/PTS23 demonstrou atividade em todas as concentrações avaliadas e mortalidade em menor tempo. Os outros compostos, embora não tenham causado mortalidade, foram capazes de causar alteração de motilidade, inibição de oviposição e separação de vermes. Com relação as alterações tegumentares induzidas após incubação com LPSF/PTS23, foi possível observar alterações como destruição de tubérculos com perda de espinhos e formação de vesículas nos vermes machos e erosão do tegumento nos vermes fêmeas. A partir dos resultados obtidos através da avaliação *in vitro* frente aos vermes adultos do *S. mansoni* foi possível concluir que dentre todos derivados tioxo-imidazolidínicos avaliados, LPSF/PTS23 pode ser apontado como uma molécula promissora nos estudos de atividade esquistossomicida.

Palavras-chave: Anti-helmínticos. *Schistosoma mansoni*. Esquistossomose.

ABSTRACT

Rocha, T. J. M.: Evaluation of schistosomicidal activity of new tioxo-imidazolidinic derivatives in adult worms of *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). 2016.140f. Thesis (Phd). Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil.

Schistosomiasis mansoni is a serious parasitic disease caused by *Schistosoma mansoni*. The rationale for new therapeutic alternatives is based on the fact that in Brazil, currently, praziquantel is the only drug used for treatment of schistosomiasis, but its extensive use inevitably resulted in low rates of cure, appearance of isolates of *Schistosoma mansoni* refractories, besides having been observed adverse effects caused by this drug. So, it becomes relevant to search for new schistosomicidal molecules and, in this context, research on synthetic compounds consists of a viable alternative. The imidazolidines are represented by a group of heterocyclic substances having different pentagonal biological activities, including schistomicidal activity. In this sense, this work aimed to investigate the schistosomicidal activity of new tioxo-imidazolidinic derivatives. The synthesized molecules have been proven through spectroscopic methods in infrared and nuclear magnetic resonance of hydrogen and carbon. Pairs of adult worms of *Schistosoma mansoni* were obtained by perfusion of hepatic system and maintained in RPMI 1640 medium culture supplemented with 10% of fetal bovine serum, penicillin (100U/mL) and streptomycin (100 µg/mL). The cultures were maintained at 37° C with 5% CO₂ atmosphere, and, after 2 hours of adaptation to the culture medium, tioxo-imidazolidinic derivatives were added. The parasites were held during five days being monitored every 24 hours to assess the motility, oviposition, mating and mortality. Finally, it was evaluated the action of LPSF/PTS23 on the integument of the worms recovered in tests *in vitro* by scanning electron microscopy. The compounds LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18, LPSF/PTS19 demonstrated cytotoxicity when evaluated (up to a concentration of 10 µM) on peripheral blood mononuclear cells; LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS10, LPSF/PTS23 and LPSF/PTS24 presented low toxicity until the dosis of 100 µM. Considering the schistosomiasis activity, LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23 compounds had major activity (LPSF/PTS23 demonstrated activity in all concentrations evaluated and mortality in less time). Although the other compounds had not caused mortality, they were able to cause change of motility, inhibition of oviposition and separating of worms. Regarding the tegumentary induced changes after incubation with LPSF/PTS23, it was possible to observe changes as destruction of tubers with loss of thorns and formation of vesicles in male worms and erosion of the integument in female worms. From the results obtained by evaluating *in vitro* activities against adult *S. mansoni* worms, it was concluded that of all tioxo-imidazolidinic derivatives evaluated, LPSF/PTS23 can be pointed as a promising molecule in the studies of schistosomicidal activity.

Keywords: Anthelmintic. *Schistosoma mansoni*. Schistosomiasis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão de literatura

Figura 1	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	26
Figura 2	Imidazolidina-2,4-diona.....	36
Figura 3	Derivados tioxo-imidazolidínicos.....	36
Figura 4	Derivado imidazolidínico LPSF/FZ-4.....	37
Figura 5	Derivado imidazolidínico LPSF/PT-5.....	38
Figura 6	Derivado imidazolidínico LPSF/RZS-5.....	38
Figura 7	Derivado imidazolidínico LPSF/PT-11.....	39
Figura 8	Ultraestrutura de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	43
Figura 9	Esquema de experimento para avaliação de atividade esquistossomicida <i>in vitro</i>	50
Figura 10	Análise da avaliação da atividade <i>in vitro</i>	51

Artigos

Figura 1	Images of adults flukes <i>Schistosoma mansoni</i>	74
----------	--	----

Anexos

Figura 11	Diagrama de síntese dos novos derivados imidazolidínicos obtidos.....	129
-----------	---	-----

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Fármacos que apresentam atividade esquistossomicida empregados no tratamento da esquistossomose experimental e/ou clínica descritos na literatura.....	28
Quadro 2	Alvos biológicos de compostos esquistossomicida descritos na literatura.....	40
Quadro 3	Informações químicas dos novos derivados tioxo-imidazolidínicos....	45
Quadro 4	Relação entre derivados tioxo-imidazolidínicos e resposta biológica frente aos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	100

LISTA DE ESQUEMAS

Scheme 1 - Reagents and conditions (Article 1).....	60
Scheme 2 - Reagents and conditions (Article 2).....	88

LISTA DE TABELAS

Tabelas do artigo 1

Table 1	Cytotoxicity and <i>in vitro</i> effects of LPSF/PTS10, LPSF/PTS23 and LPSF/PTS24 against adult worms of <i>Schistosoma mansoni</i>	72
Table 2	Motility scores for control, and worms treated with derivatives with LPSF/PTS10, LPSF/PTS23, LPSF/PTS24 and praziquantel (PZQ) at different hours post-incubation.....	73

Tabela do artigo 2

Table 1	<i>In vitro</i> effects of LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 and LPSF/PTS19 against <i>Schistosoma mansoni</i> adult worms.....	89
---------	--	----

Anexos

Tabela 1	Dados físico-químicos dos derivados imidazolidínicos obtidos.....	130
Tabela 2	Dados espectroscópicos referentes às análises de RMN ¹ H (300 MHz) dos derivados PTS, utilizando-se DMSO-d ₆ como solvente.....	131
Tabela 3	Dados espectroscópicos referentes às análises de IV dos derivados imidazolidínicos.....	132

LISTA DE ABREVIACÕES E SIGLAS

mL	Mililitro (s)
μL	Microlitro (s)
μM	Micromolar
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEUA	Comissão de Ética de Uso de Animais
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CO ₂	Dióxido de Carbono
CPqAM	Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães
CMSP	Células Mononucleares de Sangue Periférico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
FACEPE	Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de Pernambuco
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HEPES	Sal sódico do ácido N-(2-hidroxietil)-piperazina-N'-(2-etanosulfônico)
IV	Infravermelho
LE	Luiz Evangelista
LINAT	Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas
LBCM	Laboratório de Biologia Celular e Molecular
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LPSF	Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
RMN ₁ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ₁ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
PPGIT	Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
PPARs	Peroxisome Proliferator Activated Receptor
Rf	Razão de frente
RPM	Rotação por Minuto
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
PZQ	Praziquantel
SFB	Soro Fetal Bovino
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
KBr	Brometo de Potássio
d	duplete
Hz	Hertz
Ppm	Parte por milhão
s	singlete
t	triplete
δ	Deslocamentos químicos

SUMÁRIO

1	CAPITULO 1: INTRODUÇÃO.....	19
2	CAPITULO 2: OBJETIVOS.....	22
	2.1. Geral.....	22
	2.2. Específicos.....	22
3	CAPITULO 3: REVISÃO DE LITERATURA.....	24
	3.1. Aspectos gerais da Esquistossomose.....	24
	3.2. Tratamento farmacológico.....	27
	3.3. Ocorrência de baixas taxas de cura e aparecimento de isolados de <i>Schistosoma mansoni</i> refratários.....	33
	3.4. Ferramentas na avaliação da atividade esquistossomicida.....	34
	3.5. Derivados de imidazolidina.....	35
	3.5.1. Derivados imidazolidínicos com atividade esquistossomicida.....	37
	3.6. Alvos biológicos de compostos esquistossomicida.....	39
	3.6.1. Tegumento do verme adulto de <i>Schistosoma mansoni</i>	41
4	CAPITULO 4: METODOLOGIA.....	45
	4.1. Delineamento e Locais da pesquisa.....	45
	4.2. Síntese dos novos derivados tioxo-imidazolidínicos.....	45
	4.3. Citotoxicidade dos derivados imidazolidínicos.....	46
	4.3.1. Teste em Células Mononucleares de Sangue Periférico.....	46
	4.4. Avaliação da atividade esquistossomicida.....	47
	4.4.1. Parasitos.....	47
	4.4.2. Animais.....	47
	4.4.3. Caramujos.....	47
	4.4.4. Infecção e exame dos caramujos.....	48
	4.4.5. Infecção dos camundongos.....	48
	4.4.6. Obtenção de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	48
	4.4.7. Avaliação da mortalidade <i>in vitro</i> de <i>Schistosoma mansoni</i>	49
	4.4.8. Avaliação das alterações tegumentares.....	52
5	CAPITULO 5: RESULTADOS.....	53
	5.1. Synthesis and biological evaluation of novel imidazolidine derivatives as candidate schistosomicidal agentes.....	55
	5.2. <i>In vitro</i> anti- <i>Schistosoma mansoni</i> and cytotoxic activities of novel imidazolidinic compounds.....	81
6	CAPITULO 6: DISCUSSÃO.....	99
7	CONCLUSÃO.....	110
8	PERSPECTIVAS.....	112
9	REFERÊNCIAS.....	114
10	ANEXO (S).....	128
	ANEXO 1 – Caracterização estrutural dos derivados imidazolidínicos.....	129
	ANEXO 2 – Parecer do CEP/CCS/UFPE.....	134
	ANEXO 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	137
	ANEXO 4 – Parecer do CEUA/FIOCRUZ/PE.....	140

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansoni (EM CID 10 B 659), causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907), originalmente chamada de bilharziose, ocupa o segundo lugar das doenças de importância na Saúde Pública (WHO, 2013), ficando atrás apenas da malária. Registros recentes da Organização Mundial de Saúde (OMS) demonstram uma incidência de cerca de 243 milhões de pessoas infectadas pelo *S. mansoni* (WHO, 2013a). A esquistossomose está associada a vinte mil mortes anuais causadas pelas consequências graves da infecção da doença, incluindo fibrose hepática e hipertensão portal em todo o mundo (WHO, 2013b).

Os dois principais medicamentos utilizados no tratamento da esquistossomose são a Oxaminiquina (OXA) (Mansil® – Pfizer S.A) e o Praziquantel (PZQ) (Farmanguinhos - Fundação Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ).

O PZQ é utilizado para tratar a esquistossomose humana, uma vez que pode eliminar os vermes adultos, durante a fase crônica da infecção (WATSON, 2009); OXA é outro fármaco disponível, mas a sua utilização é limitada, não sendo eficaz contra todas as formas do parasito (SAYED et al., 2008).

Atualmente, o PZQ tem sido o fármaco de escolha para o tratamento medicamentoso no Brasil, mas seu uso extensivo inevitavelmente culminou em baixas taxas de cura, aparecimento de isolados de *S. mansoni* refratários, além de terem sido observados efeitos colaterais causados por esse medicamento (ABDUL-GHANI et al., 2009). Portanto, a busca de novos fármacos esquistossomicidas mais eficazes se tornou necessária, nesse contexto, pesquisas com compostos sintéticos consistem numa alternativa viável, que poderiam servir de moldes para o planejamento de novos fármacos.

Políticas de incentivo à pesquisa de novos medicamentos vêm sendo estimuladas pelo Programa Especial para Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais (*Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*) (TDR) da Organização Mundial da Saúde e o DNDi (*Drugs for Neglected Diseases*) (RUMINSKI, 2011). O emprego de novos medicamentos na farmacoterapia é necessário para o tratamento de doenças já existentes ou recém-identificadas ou, ainda, para a implementação de tratamentos mais seguros e eficazes (ROBERTSON; RENSLO, 2011).

Compostos derivados da imidazolidina são representados por um grupo de substâncias heterocíclicas pentagonais possuidoras de diversas atividades biológicas (ROSSI; ZEINIK, 2000). Estudos com derivados imidazolidínicos demonstraram atividade leishmanicida

(CARVALHO et al., 2010), antifúngica, antimicrobiana e tripanocida (CATERINA et al., 2008).

As imidazolidinas tiveram no passado um representante na clínica médica como um fármaco de ação comprovada frente a vermes adultos de *S. mansoni*, o niridazol (CATTO; TRACY; WEBSTER, 1984 apud NEVES, 2010). A atividade esquistossomicida *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni* de derivados imidazolidínicos vem sendo relatado em alguns estudos publicados (ALBUQUERQUE et al., 1999; PITTA et al., 2006; SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

Tendo em vista a necessidade de buscar novos compostos esquistossomicida para o tratamento da esquistossomose mansoni e os resultados de atividade *in vitro* sobre o *S. mansoni*, ressalta a contribuição química do núcleo imidazolidínico, assim, este estudo teve como objetivo avaliar a atividade esquistossomicida de novos derivados tioxi-imidazolidínicos sobre vermes adultos de *S. mansoni*.

Assim, esta tese está organizada da seguinte forma: no capítulo 1 é apresentada a introdução e no capítulo 2 os objetivos. No capítulo 3 é apresentado o referencial que dá o suporte teórico a este trabalho. Posteriormente, no capítulo 4, são apresentados os procedimentos metodológicos utilizados. No capítulo 5 se segue a análise e discussão dos dados obtidos do artigo 1 a ser submetido ao *Journal of the Institute of Tropical Medicine of São Paulo* e os resultados e discussão dos dados obtidos do artigo 2 a ser submetido a *Brazilian Journal of Biology*. O capítulo 6 traz a discussão geral relacionando todas moléculas avaliadas com respectivas respostas biológicas frente aos vermes adultos de *S. mansoni*. O capítulo 7 demonstra as conclusões e por fim o capítulo 8 com as perspectivas.

Com este trabalho, espera-se contribuir para o processo de conscientização da comunidade científica sobre a importância da imidazolidina como alternativa para estudos de seu potencial efeito esquistossomicida em *S. mansoni*.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar a atividade esquistossomicida de novos derivados tioxo-imidazolidínicos (LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS10, LPSF/PTS18, LPSF/PTS19, LPSF/PTS23 e LPSF/PTS24) sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a citotoxicidade *in vitro* desses novos derivados em células mononucleares de sangue periférico;
- ✓ Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* desses novos derivados sobre a oviposição de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*;
- ✓ Investigar a atividade esquistossomicida *in vitro* desses novos derivados sobre o acasalamento de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*;
- ✓ Analisar a atividade esquistossomicida *in vitro* desses novos derivados sobre a motilidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*;
- ✓ Averiguar a atividade esquistossomicida *in vitro* desses novos derivados sobre a mortalidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*;
- ✓ Estudar as alterações tegumentares em vermes adultos de *Schistosoma mansoni* induzidas por exposição *in vitro* ao derivado de maior atividade esquistossomicida *in vitro*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Aspectos gerais da esquistossomose

As esquistossomoses são causadas por trematódeos digenéticos, pertencentes ao gênero *Schistosoma*. Das espécies de *Schistosoma* que parasitam o homem, as de maior relevância são: *S. mansoni* (SAMBON, 1907), *Schistosoma haematobium* (BILHARZ, 1852) e *Schistosoma japonicum* (KATSURADA, 1904), causadores, respectivamente, da esquistossomose mansoni, hematóbica e japônica (WHO, 2013a). A esquistossomose mansoni é decorrente da infecção humana pelo trematódeo parasito *S. mansoni* (única espécie encontrada no Brasil) (TELES; CARVALHO, 2008).

A esquistossomose mansoni é transmitida por caramujos de água doce, hermafroditas e pertencentes ao gênero *Biomphalaria* da família Planorbidae. Três espécies de *Biomphalaria* são responsáveis pela transmissão da esquistossomose no continente americano: *Biomphalaria glabrata*, *Biomphalaria tenagophila* e *Biomphalaria straminea*. A espécie *B. glabrata* é o principal hospedeiro intermediário da esquistossomose no Brasil e é a espécie mais estudada devido a sua ampla distribuição geográfica (MORGAN et al., 2001; RAPADO et al., 2011). O controle dos caramujos é realizado principalmente com a adição de substâncias moluciscida, sendo principalmente utilizado a Niclosamida® (TELES; CARVALHO, 2008).

As estimativas são de 6 a 8 milhões de pessoas infectadas pelo parasito no Brasil. A região Nordeste apresenta mais da metade dos casos registrados em 2011 de esquistossomose mansoni, seguido da região Sudeste. Os estados endêmicos são Alagoas, Maranhão, Bahia, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Paraíba, Sergipe, Espírito Santo e Minas Gerais (BRASIL, 2014).

Os vermes de *S. mansoni*, são parasitos delgados e longos. O macho é esbranquiçado, com aproximadamente 10 mm de comprimento. Possui uma ventosa anterior oral, afunilada, e, próxima a esta, uma segunda ventosa pedunculada, o acetábulo. O espaço entre as duas ventosas é desprovido de tubérculos, espinhos e papilas sensoriais. A ventosa apresenta uma musculatura formada por músculos (REY, 2008; WHO, 2013a).

O sistema digestivo dos vermes adultos inicia com a boca encontrada no centro da ventosa oral, sendo esta, responsável pela ingestão de alimentos e excreção dos resíduos oriundos do metabolismo. Possui um esôfago curto. Os cecos intestinais percorrem lateralmente o corpo do verme, e na extremidade média corporal, se unem formando um ceco

único em formato terminal de saco. No aparelho digestivo são encontradas enzimas do tipo peptidases responsáveis pela digestão do sangue ingerido do hospedeiro (CAFREY, 2004).

O verme macho do *S. mansoni* possui um sistema reprodutor composto por seis a dez lóbulos testiculares. Apresenta o corpo achatado dorsoventralmente e enrolado de modo a formar uma calha ou tubo longitudinal, que recebe o nome de canal ginecóforo. Esse canal tem a finalidade de albergar a fêmea na hora do acasalamento e apresenta poucos tubérculos, ausência de espinhos e tegumento poroso próximo ao poro genital, apesar de não possuir receptores sensoriais (REY, 2008).

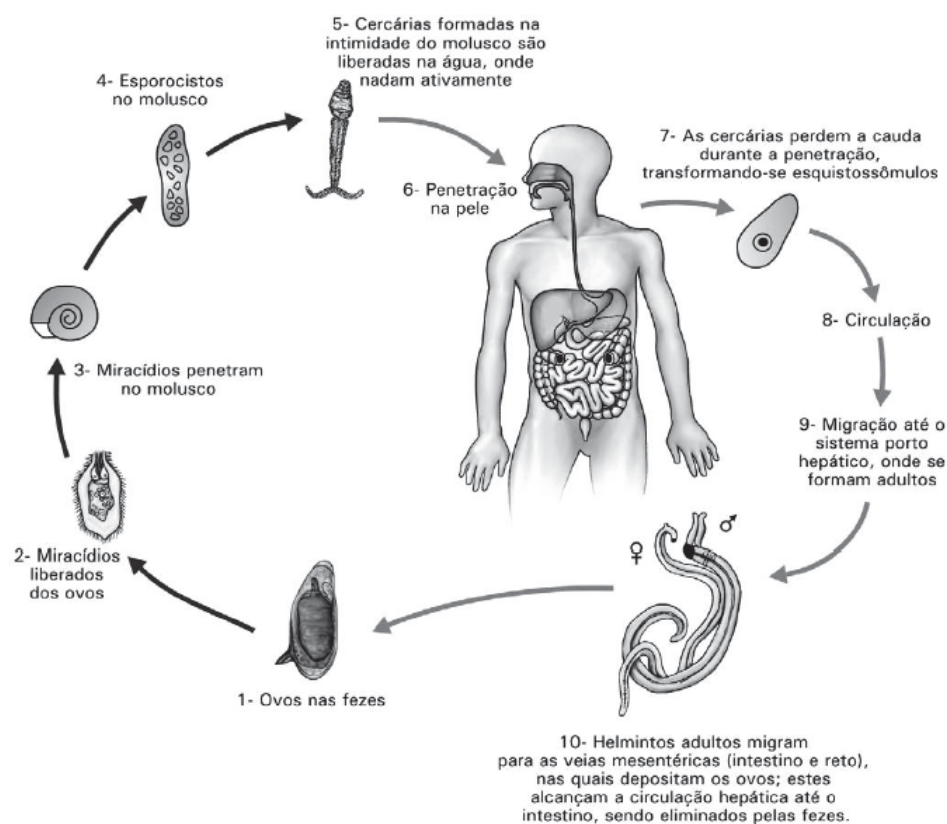
O verme fêmea de *S. mansoni* tem o corpo cilíndrico com um comprimento médio de 14 mm, sendo mais longa e mais fina que o macho. Possui cor acinzentada e escura, devido à hemozoína presente no tubo digestivo oriundo do processo digestivo do sangue. Também possuem duas ventosas, muito próximas uma da outra (KNOBLOCH; KUNS; GREVELDING, 2006).

O tegumento do verme é uma estrutura muito importante para a nutrição por absorção, excreção de alguns metabólitos e proteção dos vermes contra o seu hospedeiro. Os vermes adultos possuem um revestimento externo que, por microscopia eletrônica de varredura, indica a presença de tubérculos e espinhos situados na superfície interna das ventosas, de uma citomembrana formada por sete camadas e um glicocálix, rico em carboidratos na sua superfície exterior (REY, 2008).

Os parasitos tornam-se adultos na luz dos vasos sanguíneos do seu hospedeiro definitivo, habitando as vênulas do plexo hemorroidário superior e as ramificações mais finas das veias mesentéricas, principalmente a inferior, onde as fêmeas iniciam a postura dos ovos (STANLEY et al., 2009). Cada fêmea produz cerca de 100-300 ovos por dia. Uma grande parte dos ovos migra para o lúmen do intestino, enquanto outra parte acaba sendo levada pela veia porta para o fígado (SILVA, CHIEFFI; CARRILHO, 2005).

O ciclo evolutivo do *S. mansoni* (Figura 1) é do tipo heteroxênico, pois necessita de dois hospedeiros para finalizar o seu desenvolvimento. O hospedeiro intermediário são caramujos do gênero *Biomphalaria* (GRYSEELS et al., 2006), e o hospedeiro definitivo podem ser o homem ou outros vertebrados, tais como hamster, camundongo ou coelho (CALDEIRA; JANNOTTI-PASSOS; CARVALHO, 2009).

Figura 1 – Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.



Fonte: Ribeiro (2013)

Os aspectos patológicos da esquistossomose mansoni são representados por uma forma aguda ou formas crônicas (LAMBERTUCCI et al., 2000). A forma aguda se caracteriza por ser na maioria das vezes assintomáticas ou apresentando sinais clínicos bem diversificados, como por exemplo: dermatite cercariana com erupção papular, eritema, edema e plurido (PORDEUS et al., 2008). Outras manifestações comuns são febre, dor de cabeça, náuseas, anorexia, vômitos, diarreias, perda de peso e nível de eosinofilia elevado (PORDEUS et al., 2008). Outros sintomas vão surgindo devido à migração e posterior posicionamento dos vermes adultos, tais como dores abdominais, toxemia, esplenomegalia, hepatoesplenomegalia e exantema generalizado (GRYSEELS et al., 2006).

A fase crônica da esquistossomose ocorre com maior frequência em áreas endêmicas, onde indivíduos, normalmente assintomáticos, passam a demonstrar manifestações clínicas. Vários são os fatores que podem estar envolvidos no desenvolvimento da patogenia, dentre eles: a carga parasitária da infecção, (FILHO; SILVEIRA, 2001), o estado nutricional e a resposta imunológica do indivíduo infectado (REY, 2008). A forma crônica tem início alguns

meses após a infecção acometendo vários órgãos de forma grave, apresentando formas intestinais, hepatointestinal, hepatoesplênica e ectópicas (PORDEUS et al., 2008).

O diagnóstico da infecção pelo *S. mansoni* acontece principalmente quando há a presença de ovos nas fezes do indivíduo infectado (PORDEUS et al., 2008). A rápida identificação da esquistossomose é importante para a diminuição da taxa de transmissão e principalmente, para o rastreamento de áreas endêmicas (BECK et al., 2008).

3.2. TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

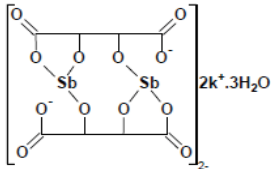
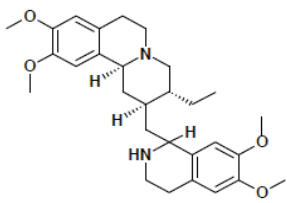
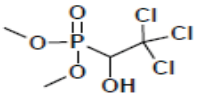
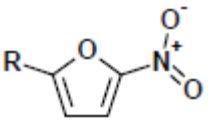
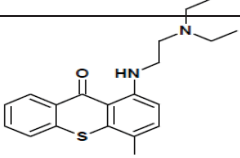
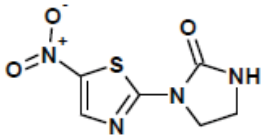
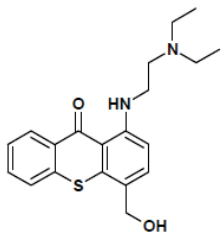
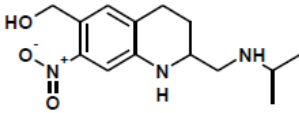
O PZQ (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino{2,1-a}isoquinolin-4-ona) (PZQ) é classificado como uma pirazino-isoquinolina que foi descoberta em 1970 (GREENBERG, 2005). É considerado o fármaco de escolha para o processo terapêutico da esquistossomose por ser eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma* (TALLIMA; RIDI, 2007; BETHONY et al., 2011).

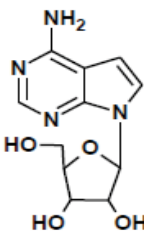
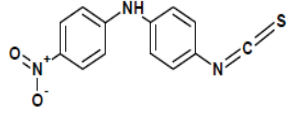
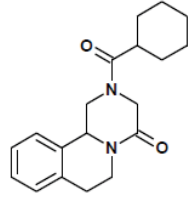
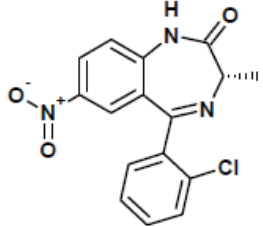
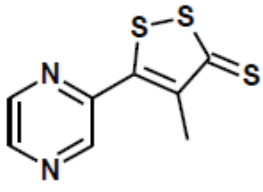
Contudo, esse medicamento pode provocar efeitos adversos mutagênicos e teratogênicos, bem como o surgimento de isolados de *S. mansoni* refratários (MELMAN et al., 2009). Esses efeitos, juntamente com a alta incidência dessa parasitose, demonstram a necessidade de desenvolver medicamentos eficazes e com menos efeitos adversos (EL-LAKKANY; EL-DIN, 2013).

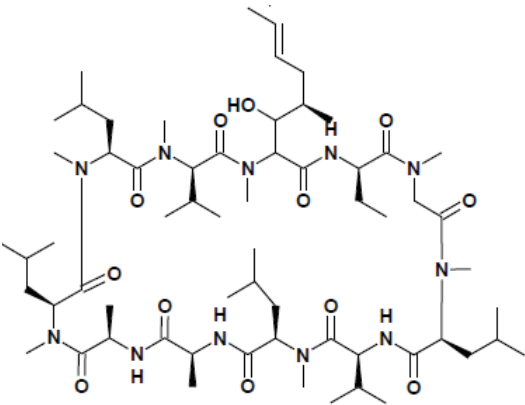
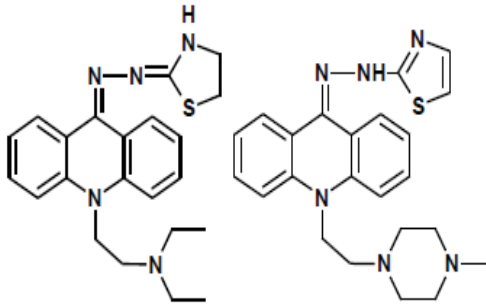
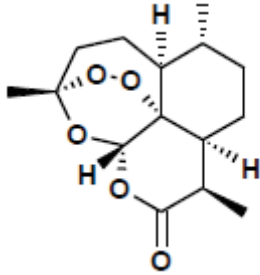
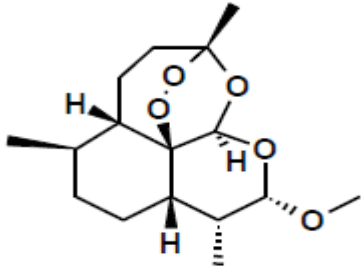
Acredita-se que o mecanismo de ação do PZQ seja processo dependente de Ca^{2+} (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995), uma vez que foi demonstrado, em experimentos *in vitro*, realizados em meio de cultura livre de Ca^{2+} , o bloqueio dessas respostas. Sugere-se, ainda, que o PZQ atue inibindo canais de cálcio (GREENBERG, 2005), uma vez que, com a interferência na função desses canais do parasito, foi possível obter um nível significativo de inibição da atividade esquistossomicida do PZQ (PICA-MATTOCCIA; CIOLI, 2004; PICA-MATTOCCIA et al., 2008).

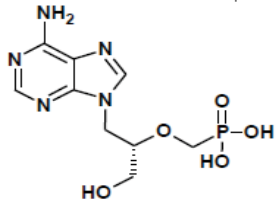
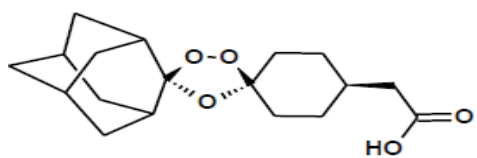
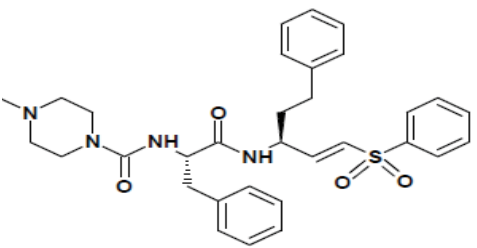
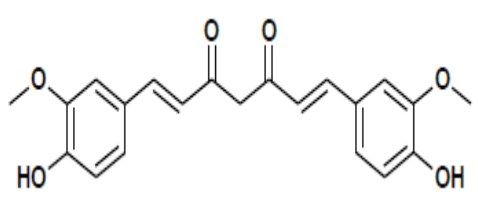
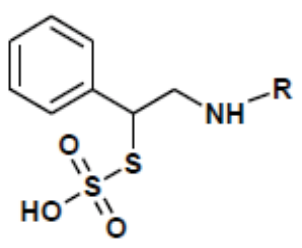
O tratamento do paciente infectado com *S. mansoni* vem sendo realizado através da quimioterapia, desde 1918, quando Christopherson sugeriu a utilização dos compostos antimoniais (CIOLI, PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995). No quadro 1 encontra-se um resumo das moléculas estudadas para compor o arsenal esquistossomicida. Nessa tabela é possível verificar que a grande maioria dos compostos entrou em desuso ou apenas foram avaliados os efeitos *in vitro* e *in vivo*, contudo os estudos clínicos para avaliar a sua efetividade em humanos não prosseguiram (FREITAS, 2015).

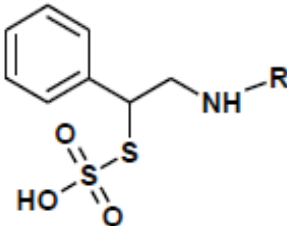
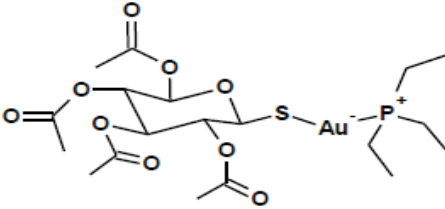
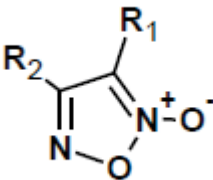
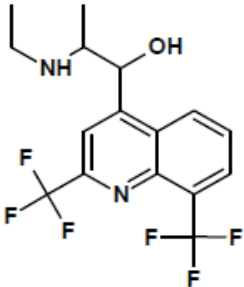
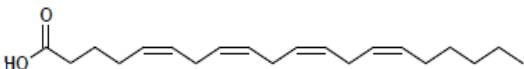
Quadro 1 – Fármacos que apresentam atividade esquistossomícida empregados no tratamento da esquistossomose experimental e/ou clínica descritos na literatura.

ANO ¹	NOME	ESTRUTURA	OBSERVAÇÕES
1918	Tártaro emético ^A		Início do uso de quimioterápicos (tóxico).
1920	Emetina ^B		Moderamente efetivo (tóxico)
1960	Metrifonato ^B		Ainda usado contra <i>S. haematobium</i>
1962	Nitrofuranos ^B		Moderamente efetivos
1962	Lucantona ^B		Substituído pela hicantona
1964	Niridazol ^B		Moderamente efetivo por via oral
1965	Hicantona ^B		Uso interrompido devido a mutagenicidade
1969	Oxaminiquina ^B		Ainda em uso em <i>S. mansoni</i>

1971	Tubercidina ^B		Atividade <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em camundongos
1976	Amoscanato ^B		Amplamente testado na China (tóxico)
1977	Praziquantel ^B		Fármaco de referência no tratamento de todas as espécies de <i>S. mansoni</i>
1978	Meclonazepan (Ro 113128) ^{B,C}		Efeito profilático e terapêutico em <i>S. mansoni</i> e <i>S. haematobium</i>
1978	Oltipraz ^B		Uso interrompido devido a problemas causado nas unhas.

1981	Ciclosporina A		Atividade profilática avaliada em animais.
1984	Hidrazona 9 acridina ^B		Ativo em camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> .
1985	Artemisinina ^C		Potente atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
1989	Artemeter ^{C,F}		Ativo contra todas as espécies de <i>Schistosoma</i>
1994	Ácidos aminoalcano-tiosulfúrico ^E		Ativo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em <i>S. mansoni</i>

2001	Myrrh (Mirazid®) ^{C,D,F}	Latex Resina oleosa do caule de <i>Commiphora molmol Engier</i>	Resultados contraditórios
2003	Análogos nucleotídeo acíclico ^F		Atividade esquistossomic ida <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>
2006	Trioxolanas (OZ78) ^{C,D,F}		Atividade esquistossomic ida <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em <i>S. mansoni</i> e <i>S. japonicum</i>
2007	Vinilsulfona (K11777) ^{C,D}		Reduziu a carga parasitária e a patologia em animais com <i>S. mansoni</i> .
2007	Curcumina ^{F,H}		Potente atividade esquistossomic ida <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> em <i>S. mansoni</i>
2007	Tiosulfatos alquilamino alcanos ^{E,G}		Ativo sobre fêmeas de <i>S. mansoni</i>

2007	Tiosulfatos alquilamino alcanos ^{E,G}		Ativo sobre fêmeas de <i>S. mansoni</i>
2007	Auranofina ^C		Ativo em todas as fases do <i>S. mansoni</i>
2008	Oxadiazol ^I		Ativo em todas as fases do <i>S. mansoni</i> e <i>S. japonicum</i>
2009	Mefloquina ^F		Ativo <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> sobre <i>S. mansoni</i>
2010	Ácido araquidônico ^F		Ativo em <i>S. mansoni</i> e <i>S. haematobium</i>

^IAno da descoberta ou da publicação; ^A (CIOLI, PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995); ^B (CIOLI, 1998); ^C (ANGELUCCI et al., 2011); ^D (ABDUL-GHANI et al., 2009); ^E (CAFREY, 2007); ^F (EL RIDI; TALIMA, 2013); ^G (DE OLIVEIRA PENIDO et al., 2008); ^H (MAGALHÃES et al., 2009); ^I(SAYED et al., 2008).

No momento não existe vacina disponível para esquistossomose, contudo, várias proteínas de *S. mansoni* vem sendo testadas como possível candidatos a vacina. Dentre as proteínas que estão em fase de testes clínicos encontram-se a Sm14 e Sm28/Sh28 GST. A Sm14 é uma proteína de 14 kDa pertencente à família de proteínas ligadoras de ácido graxos que foi identificada em uma biblioteca de cDNA de verme adulto do *S. mansoni* por soro de camundongos vacinados com extrato salino de vermes adultos (MOSER et al., 1991). Esta proteína está presente em todos os estágios do parasito no hospedeiro vertebrado. A forma recombinante desta proteína foi utilizada com sucesso em protocolos de imunização no modelo murino, sendo capaz de induzir uma redução parcial no número de vermes adultos variando de acordo com o adjuvante utilizado, porém, sem nenhum efeito sobre a área do granuloma hepático (RIBEIRO et al., 2002; FONSECA et al., 2004).

3.3. OCORRÊNCIA DE BAIXAS TAXAS DE CURA E APARECIMENTO DE ISOLADOS DE *Schistosoma mansoni* REFRATÁRIOS

O uso prolongado e único do PZQ para o tratamento da esquistossomose mansoni tem acarretado o surgimento de cepas do *S. mansoni* refratárias. Isso pôde ser observado em estudos com vilarejos do Egito, onde alguns pacientes infectados não demonstraram resultados significantes após o tratamento com o PZQ (ISMAIL et al., 1996). Relatos semelhantes ocorreram no Vietnã (RONKETTI et al., 2007).

No Senegal a taxa de cura dos pacientes tratados com uma dose de 40mg/kg foi de apenas 36-39%, todavia, esses indivíduos apresentaram redução da quantidade de ovos em cerca de 85%. Na tentativa de se obter uma melhor eficácia no tratamento, passou-se a administrar uma maior dose do PZQ (60mg/kg). Porém, não houve aumento de cura significativo, implicando então no levantamento de hipóteses, dentre elas o surgimento de isolados de *S. mansoni* refratários ao PZQ, que foi posteriormente comprovado através de várias pesquisas e repetições dos experimentos nos senegaleses infectados (STELMA, SALL; DAFF, 1997).

No Egito, o PZQ é utilizado desde 1980 (FALLON, 1998). Todavia, nos últimos anos, houve uma baixa taxa de cura em pacientes tratados com esse medicamento. Isso pôde ser verificado em mais de mil pessoas infectadas residentes nas regiões do Delta no Nilo, onde após tratamentos sucessivos, com doses de 40mg/kg e posteriormente, com doses de 60mg/kg foi possível encontrar ovos viáveis nas fezes desses indivíduos. Esses estudos contribuem

para a constatação de uma possível existência de isolados do *S. mansoni* refratários ao PZQ (ISMAIL et al., 1996; 1999).

Isolados de *S. mansoni* refratários também podem ser visto em trabalhos experimentais *in vivo*, como foi o caso de camundongos infectados tratados que apresentaram refratariedade ao PZQ no Senegal e no Egito (STELMA, SALL; DAFF, 1997) e *in vitro*, na qual os vermes adultos do *S. mansoni* tratados com o PZQ, demonstraram um decréscimo significativo das respostas do medicamento frente ao parasito, incluindo diminuição da contração muscular, destruição tegumentar e influxo de cálcio (ISMAIL et al, 1996). Assim, a descoberta de novos fármacos esquistossomicidas para o tratamento da esquistossomose mansoni é de grande relevância (SILVA et al., 2012).

3.4. FERRAMENTAS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA

A descoberta de novas moléculas esquistossomicidas é um processo complexo que requer tempo e altos custos, possuindo suas raízes altamente ligadas as inovações científicas e tecnológicas. Os avanços significativos das ciências que levaram a uma melhor compreensão das vias bioquímicas, alvos moleculares e de mecanismos de doenças, tornaram possível a descoberta de inovações terapêuticas conhecidas, realizando melhorias na qualidade de vida das pessoas (GUIDO; OLIVA, 2009).

Testes *in vitro* são realizados para avaliar os candidatos a fármacos para se obter a sua relação do seu potencial agonista ou antagonista. Partindo dessa seleção inicial, outros testes são realizados como o *in vivo*, para se verificar seu efeito farmacológico. No entanto, muito desses candidatos a fármacos que se mostraram com boa atividade nos testes *in vitro* (PITTA et al., 2006), nem sempre tem uma mesma resposta no teste *in vivo* (SILVA et al., 2012). Muitas das vezes, essa falha se corresponde a problemas farmacocinéticos desses compostos como sua baixa biodisponibilidade, baixa ou alta duração de ação e até a presença de metabólitos (PEREIRA, 2007).

Assim, a química medicinal vem se destacando no seu papel na produção e desenvolvimento de fármacos onde existem várias estratégias que se empregam para o desenho molecular podendo ser levado a síntese de um novo fármaco possível candidato a agente terapêutico. Essas estratégias são essenciais porque aperfeiçoam essas modificações moleculares, consequentemente diminuindo efeitos colaterais e aumentando seu potencial. Dentre elas, destaca-se para este trabalho o bioisosterismo (GUIDO; OLIVA, 2009).

Bioisosterismo é uma estratégia da química medicinal para o desenho racional de novos fármacos, aplicados a um composto farmacofórico como um processo especial de modificação molecular que relacionados apresentam propriedade biológica agonista ou antagonista. É a substituição ou modificação de um grupo funcional por outro grupo possuindo semelhantes propriedades físico-químicas (MANNHOLD, KUBINYI; FOLKERS, 2012; SETHY et al., 2013).

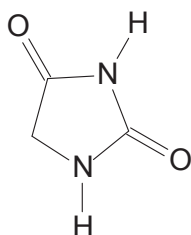
O avanço da biologia nas últimas décadas, em especial na área molecular, associado a avanços tecnológicos, com o desenvolvimento de computadores velozes e com grande capacidade para armazenamento de informações, proporcionou o surgimento de uma das mais promissoras áreas de estudo, a bioinformática. Esta nova ciência surge da necessidade de se analisar o crescente volume de dados gerados a partir dos investimentos em novas tecnologias moleculares. Assim, a bioinformática pode ser definida como a união de áreas já conhecidas e indispensáveis à biologia moderna, como matemática, estatística e ferramentas computacionais, com a biologia molecular para as mais diversas aplicações (GOLDING, 2003; XIONG, 2006).

A farmacocinética teórica *in silico* é uma abordagem atualmente muito utilizada no estudo inicial das propriedades ADMET (Absorção, Distribuição, Metabolização, Excreção e Toxicidade – também chamada de ADME/Tox) que tem como objetivo diminuir o gasto desnecessário em ensaios biológicos de compostos com alta probabilidade de problemas farmacocinéticos e tóxicos futuros, economizando tempo e investimento (KADAN, 2007).

O aprimoramento destas propriedades através das modificações moleculares desses compostos é essencial na seleção de candidatos a fármacos com maiores probabilidades de não serem abandonados na fase clínica. A frustração na fase clínica significa grandes perdas de tempo e dinheiro (PEREIRA, 2007).

3.5. DERIVADOS DE IMIDAZOLIDINA

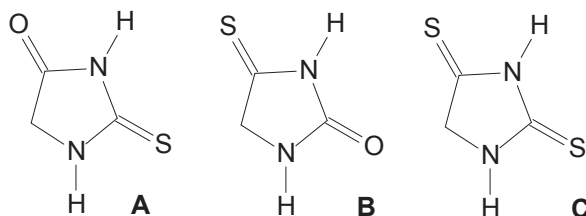
As imidazolidina-2,4-dionas ou hidantoínas (Figura 2) são compostos heterocíclicos pentagonais isósteros das tiazolidinas, que possuem dois átomos de nitrogênio e duas carbonilas no anel (FINKBEINER, 1965). Ela foi descoberta por Bayer em 1861, através da reação da bromo-acetiluréia com amônia em meio alcoólico, sob aquecimento (WARE, 1950 apud SILVA, 2014).

Figura 2 - Imidazolidina-2,4-diona

Sua primeira fórmula estrutural foi sugerida por Kolbe, em 1870, modificada por Strecker no mesmo ano, propondo uma nova fórmula e desde então tem sido intensamente estudada (WARE, 1950 apud SILVA, 2014). O interesse por esse anel tem sido amplamente centrado na obtenção natural da imidazolidina e pela síntese de uma variedade de compostos para uso farmacêutico (FINKBEINER, 1965 apud SILVA, 2014).

Esforços para o desenvolvimento de novas técnicas de síntese dos derivados imidazolidínicos tem sido feita, ao exemplo do uso do multi-passo convencional, *one-pot*, em fase sólida e a assistida por micro-ondas já estão sendo publicadas, com objetivo de serem mais eficientes e com menores custos (KURZ; WIDYAN, 2004).

A substituição dos átomos de oxigênio carbonílicos da imidazolidina por átomos de enxofre origina tioxo-derivados-imidazolidínicos. Klason, em 1890, sintetizou os primeiros derivados, a 2-tioxo-imidazolidin-4-ona, a 4-tioxo-imidazolidin-2-ona e a imidazolidina-2,4-ditiona (Figura 3) (OLIVEIRA et al., 2008). De acordo com Ware 1950, os compostos tiocarbonilados são preparados e isolados mais facilmente do que os compostos carbonilados, além de serem mais reativos. Edward, em 1966, destaca o aumento da polarização do grupo tiocarbonila evidenciado pela substituição do oxigênio pelo enxofre.

Figura 3 - Derivados tioxo-imidazolidínicos. A) 2-tioxo-imidazolidin-4-ona. B) 4-tioxo-imidazolidin-2-ona. C) imidazolidina-2,4-ditiona (OLIVEIRA et al., 2008).

A imidazolidina é um farmacóforo importante, que está presente em vários compostos biologicamente ativos. Nas últimas décadas, a indústria farmacêutica vem se dedicando nas pesquisas na modificação estrutural das imidazolidinas e de seus derivados (KURZ; WIDYAN, 2004).

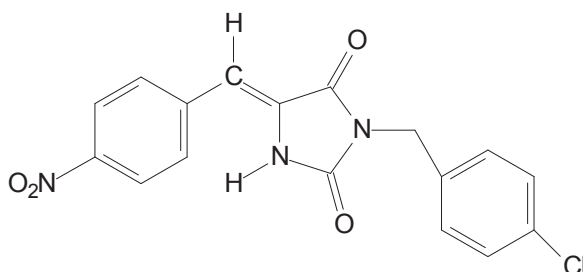
Os derivados imidazolidínicos já são conhecidos na literatura pelo seu amplo espectro de atividades biológicas, como por exemplo, atividade analgésica (JI et al., 2006), anticonvulsivante (CORTES et al., 1985), antifúngica (SAHA et al., 2000), antioxidante inibidor do óxido nítrico (SORRENTI et al., 2006), antiarrítmica (PEKALA et al., 2005), antimicrobiana (CATERINA et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 1999), anticâncer (KAMINSKY, ZIMENKOVSKY; LESYK, 2009), Anti-HIV (COMBER et al., 1992; FLOSI et al., 2006), anti-inflamatória (GUERRA et al., 2011), antinociceptiva (GUERRA et al., 2011), anti-*Trypanosoma cruzi* (GOMES et al., 2012), esquistossomicida (SILVA et al., 2012; NEVES et al., 2011, 2010; PITTA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2004; ALBUQUERQUE et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2015).

3.5.1. Derivados imidazolidínicos compostos com atividade esquistossomicida

O Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos - LPSF pertencente ao Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica – NUPIT/UFPE apresenta alguns trabalhos na literatura com derivados imidazolidínicos e suas atividade esquistossomicida, e patentes vêm sendo geradas (WO 2012/119212 A1) confirmando assim, a importância das imidazolidinas como um composto bioativos (PITTA et al., 2005).

No estudo *in vitro* com vermes adultos de *S. mansoni*, o composto (Z)-3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ-4) (Figura 4) na concentração de 120 µg/mL apresentou uma mortalidade de 100% no 12º dia de observação (OLIVEIRA et al., 2004).

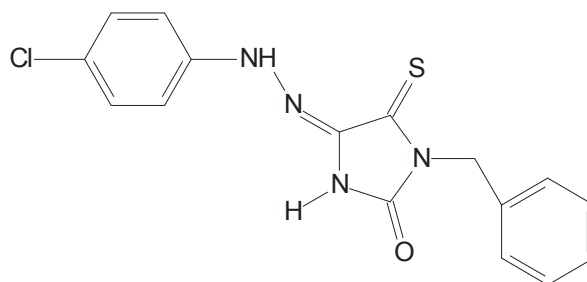
Figura 4 - Derivado imidazolidínico LPSF/FZ-4 (OLIVEIRA et al., 2004).



Sete novos derivados imidazolidínicos foram testados *in vitro*, todos os compostos se mostraram ativos, porém destacou-se o derivado LPSF/PT-5 (1-benzil-4-[(4-cloro-fenil)-hidrazono]-5-tioxo-imidazolidin-2-ona) (Figura 5). O LPSF/PT-5 se mostrou o mais ativo frente aos vermes de *S. mansoni* na concentração de 58 µM, que foi possível atingir a taxa de

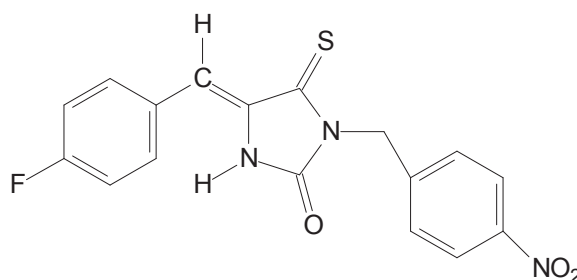
mortalidade de 100% após 24h de contato com o verme. Foi possível observar que todos os compostos testados provocaram alterações da superfície do parasito como a formação de bolhas e descamação (PITTA et al., 2006).

Figura 5 - Derivado imidazolidínico LPSF/PT-5 (PITTA et al., 2006).



Dois compostos imidazolidínicos foram testados por Neves et al. (2010), o 5-(4-cloro-benzilideno-3-(4-nitrobenzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/RZS-2) e o 5-(4-fluoreto-benzilideno-3-(4-nitrobenzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/RZS-5) ambos apresentaram atividade em vermes adultos de *S. mansoni*. Porém, o destaque fica com o composto LPSF/RZS-5 (Figura 6). O composto LPSF/RZS-5 obteve 100% de mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* após 24h de observação na concentração de 640 μ M, além de ter sido observada alterações tegumentares com o aparecimento de bolhas, falta de aderência a placa e ausência de ovos.

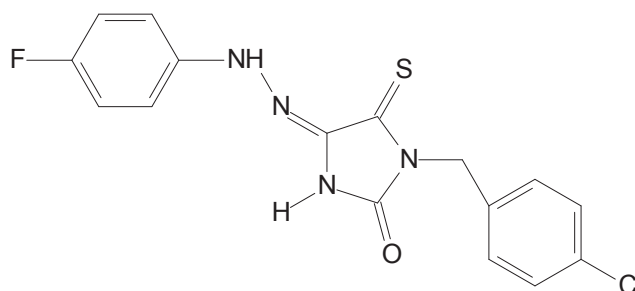
Figura 6 - Derivado imidazolidínico LPSF/RZS-5 (NEVES et al., 2010)



Neves et al. (2011) avaliaram dois compostos imidazolidínicos *in vitro*, dentre eles o LPSF/PT-11 (1-(4-cloro-benzil)-4-[(4-fluoro-fenil)-hidrazono]-5- tioxo-imidazolidin-2-ona) (Figura 7). Nas concentrações de 320, 200 e 100 μ M em 24h de observação, o composto provocou mortalidade total dos parasitos. O LPSF/PT-11 se mostrou com baixa citotoxicidade e os testes de ultraestrutura, os parasitos tratados com o composto imidazolidínico apresentaram comportamento corporal similar aos parasitos tratados o PZQ (formação de

bolhas, descamação do tegumento, perda dos espinhos do tubérculo, inchaço e alongamento corporal).

Figura 7 - Derivado imidazolidínico LPSF/PT-11 (NEVES et al., 2011).



Estes resultados promissores fazem com o que o LPSF/NUPIT/UFPE continue a planejar e sintetizar novos derivados imidazolidínicos como candidatos a fármacos esquistossomicida.

3.6. ALVOS BIOLÓGICOS DE COMPOSTOS ESQUISTOSSOMICIDA

Diferentes alvos biológicos tem sido avaliados como possíveis formas de mecanismo de ação de moléculas esquistossomicida, o quadro 2, demonstra resumidamente as vias de interesse de estudo.

Quadro 2 – Alvos biológicos de compostos esquistossomicida descritos na literatura.

<i>Vias de Sínteses de Purinas</i>	As vias de síntese de purinas são de grande importância para a sobrevivência de <i>S. mansoni</i> , pois elas estão relacionadas com as sínteses de ácidos nucleicos, proteínas e outros metabólitos envolvidos nas reações energéticas (KOUNI, 2003; CASTILHO, 2010).
<i>Tiorredoxina Glutathione Redutase</i>	Os vermes adultos de <i>S. mansoni</i> encontram-se em um ambiente aeróbico nos seus hospedeiros e estão constantemente expostos a espécies reativas de oxigênio através da respiração e como resultado da resposta imune do seu hospedeiro (ALGER et al., 2002). Devido a isso, os vermes adultos precisam de um sistema adequado a fim de controlar esse estresse oxidativo desenvolvido pelo seu hospedeiro (SAYED et al., 2008).
<i>Proteases Cisteínas</i>	As proteases cisteínas são fundamentais para o metabolismo de muitos parasitos (SAJID; McKERROW, 2002). Os vermes de <i>S. mansoni</i> se caracterizam por expressar numerosas proteases cisteínas as quais estão relacionadas com sua digestão, reprodução e na síntese de proteínas (CAFREY et al., 2004). Estudos com os inibidores fluorometil cetona diminuíram a carga parasitária e dos ovos em camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> (WASILEWSKI et al., 1996).
<i>Proteína Tirosina Quinase</i>	Os vermes de <i>S. mansoni</i> apresentam dois tipos de PTKs, a tirosina quinase 3 (TK3) e a tirosina quinase 5 (TK5), ambas exibindo atividades no aparelho reprodutor das fêmeas de <i>S. mansoni</i> , mas especificamente nas células vitelínicas e no ovário, sugerindo desse modo, que as TKs estejam relacionadas no desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino desses parasitos (KAPP et al., 2004; KNOBLOCH et al., 2002).
<i>DNA Topoisomerases</i>	Características bioquímicas dos vermes de <i>S. mansoni</i> tem sido amplamente estudadas e caracterizadas destacando as DNA topoisomerases como possíveis alvos na descoberta de novos agentes esquistossomicidas (ABDUL-GHANI, LOUTFY; HASSAN, 2009). Relacionados a isso, surgem os compostos acridínicos, fármacos que possuem como mecanismo de ação já comumente elucidado a capacidade de se intercalar a moléculas de DNA e inibir as enzimas topoisomerases I e II responsáveis pelo processo de replicação celular (YANG et al., 2006).
<i>PPARγ</i>	A fibrose hepática é um processo patológico crônico encontrado na esquistossomose mansoni sendo um problema clinicamente sério e fundamental diante dos diversos tipos de doenças existentes no fígado, mesmo se apresentando como um processo progressivo, a fibrose hepática pode se tornar até em uma fase avançada, um processo reversível (VENNERVALD et al., 2005). Baseado nisso e em outras questões relevantes, aumenta-se o otimismo em relação a uma possível regressão total da fibrose hepática através de terapias que travem o processo de fibrinogênese e ao mesmo tempo, incentivem as propriedades naturais de regeneração do fígado (MUDDU et al., 2007).
<i>Canais de Cálcio</i>	Os canais de cálcio encontrados nos parasitos de <i>S. mansoni</i> estão relacionados com o mecanismo de ação do agente esquistossomicida PZQ. No entanto, esta via de mecanismo ainda continua desconhecida (DOENHOFF, CIOLI; UTZINGER, 2008). Os canais de cálcio são complexos protéicos formados por subunidades moduladoras denominadas β -subunidades (JEZIORSKI; GREENBERG, 2006), responsáveis pela regulação do fluxo de Ca^{2+} e que podem estar envolvidas nesse mecanismo de ação (TALLIMA; RIDI, 2007).
<i>Sistema Neuromuscular</i>	O sistema neuromuscular dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> é considerado alvo para a descoberta de novos fármacos esquistossomicida. Apesar de o parasito possuir um sistema de neurotransmissão e controle da atividade motora qualitativamente semelhante ao dos mamíferos, pesquisas detalhadas baseadas na modulação farmacológica dos receptores envolvidos e nas proteínas relacionadas no controle homeostático do cálcio demonstrou apresentar diferenças entre o parasito e o hospedeiro, sugerindo a possibilidade de se haver a síntese de moléculas relativamente específicas (NOEL, 2008).

Alguns estudos publicados que visam determinar o possível alvo biológico de moléculas esquistossomicida tem avaliado principalmente os danos tegumentares em vermes adultos de *S. mansoni* através de microscopia eletrônica de varredura.

3.6.1. Tegumento do verme adulto de *Schistosoma mansoni*

A integridade do tegumento e a função da membrana superficial são de grande importância para a sobrevivência ao parasito quando em contato com o ambiente do hospedeiro infectado. Isso se deve ao fato dessas estruturas possuírem um papel vital na evasão a resposta imune, absorção de nutrientes, assimilação seletiva das drogas, metabolismo do colesterol e lipídios e de vários outros processos fisiológicos (FAGHIRI; SKELLY, 2009; PEREIRA et al., 2011).

O tegumento é um complexo sincicial que forma uma interface importante entre o parasito e o hospedeiro e pode apresentar-se como principal rota para absorção da glicose, aminoácidos e outros nutrientes de forma similar, e também a excreção de produtos metabólicos de como ácido láctico. A interação entre moléculas do hospedeiro e *S. mansoni* pode ser considerada a característica chave para a sobrevivência (CAMACHO; AGNEW, 1995 *apud* OLIVEIRA et al., 2008).

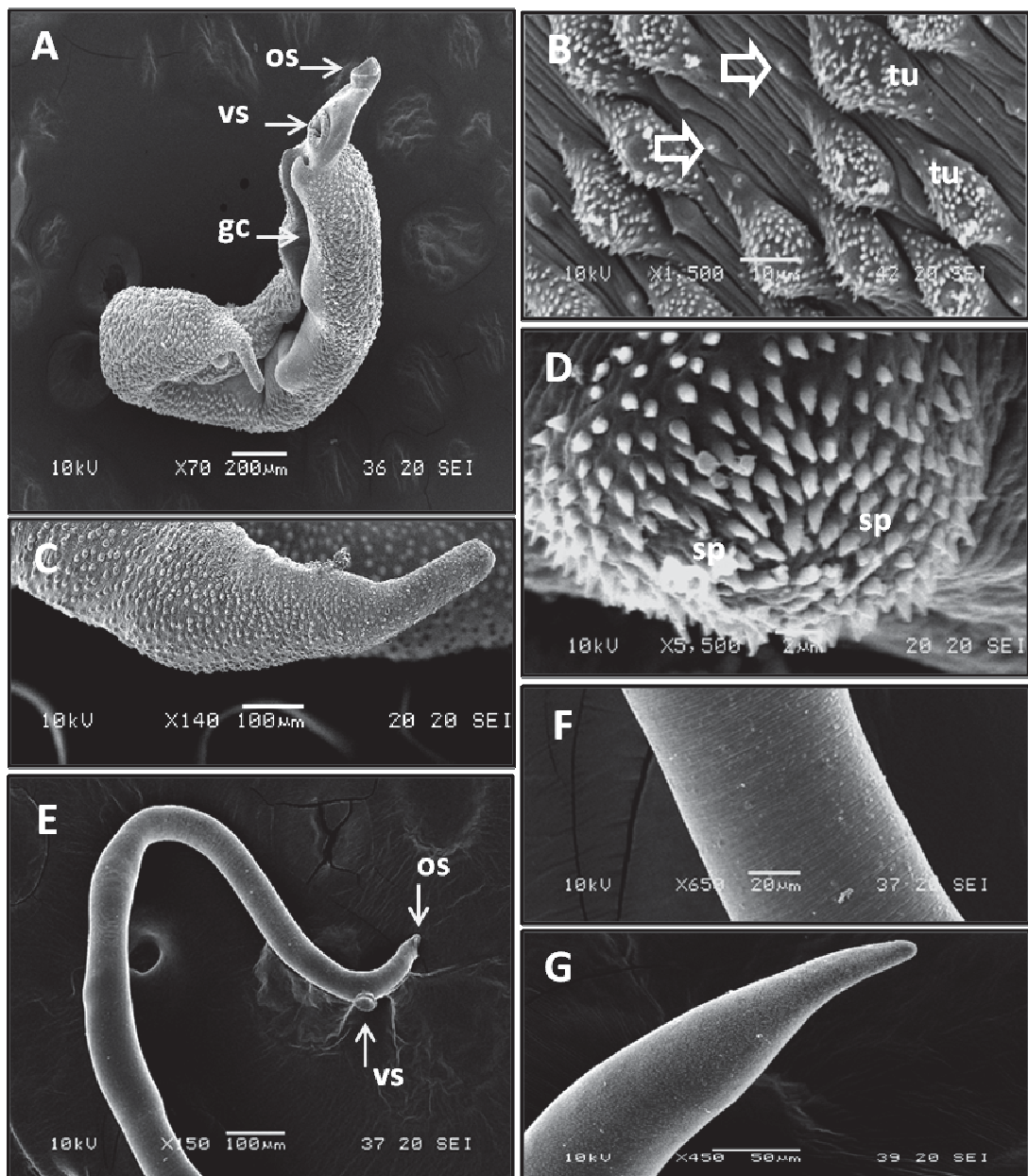
Embora o verme adulto possua a função intestinal na qual está envolvido, ingestão e digestão de células e macromoléculas, existe um grande tráfego de moléculas pequenas através do seu tegumento. A superfície da membrana do tegumento também liga uma grande variedade de moléculas do hospedeiro, tais como: imunoglobulina e lipoproteínas sobrevivência (RAMALHO-PINTO et al., 1978 *apud* OLIVEIRA et al., 2008). A figura 8 apresenta as principais características ultraestruturais em vermes adultos de *S. mansoni*.

Uma ferramenta sensível para a identificação de lesões tegumentares em *S. mansoni* é a utilização da microscopia eletrônica de varredura (MEV), que pode ser usada como parâmetro para avaliar compostos quanto a prováveis atividades esquistossomicida.

Sabendo-se que a superfície tegumentar se encontra entre o ambiente do parasito e o hospedeiro, e que é responsável por apresentar proteínas envolvidas na resposta imune e no reparo de qualquer dano causado pelo hospedeiro definitivo, a estrutura tegumentar torna-se um potencial alvo biológico para a atuação de um candidato a fármaco esquistossomicida (XIAO et al., 2002).

Existem diversas alterações tegumentares em vermes adultos de *S. mansoni* que são descritas na literatura tais como inchaço, fusão de cristas tegumentares, vacuolização, descamação, erosão e colapso do tegumento (XIAO et al., 2001). Estudos indicam que essas alterações tegumentares podem levar ao desaparecimento da resposta imunológica ao parasito, acarretando uma vulnerabilidade maior diante do hospedeiro (XIAO et al., 2001). Em adição a isso, a destruição de tegumento compromete a absorção de nutrientes, o que pode ocasionar diminuição do metabolismo no parasito e até a sua morte (NAHED et al., 2009).

Figura 8 – Ultraestrutura de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, macho e fêmea processados por Microscopia Eletrônica de Varredura: A) Verme macho com presença de ventosa oral (os), ventosa ventral (vs) e canal ginecóforo (gc). B) Distribuição de tubérculos (tu) ao longo do corpo papilas sensoriais (seta). C) Porção caudal do verme macho. D) Detalhe de espinhos e tubérculos (sp). E) Verme fêmea com presença de ventosa oral (os) e ventosa ventral (vs). F) Tegumento do verme fêmea com tubérculos. G) Porção caudal do verme fêmea.



4. METODOLOGIA

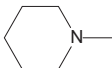
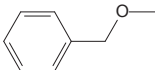
4.1. DELINEAMENTO DA PESQUISA E LOCAL

Foi realizada uma pesquisa experimental através de ensaios *in vitro*. O estudo foi realizado em colaboração com os seguintes laboratórios: Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF/UFPE), Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT/UFPE), Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM/CPqAM) e no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA/UFPE).

4.2. SÍNTESE DOS NOVOS DERIVADOS TIOXO-IMIDAZOLIDÍNICOS

As sínteses, dados físico-químicos, caracterização estrutural por meio do RMN¹H, ¹³C, IV e espectrometria de Massas dos novos derivados imidazolidínicos LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, PLPSF/TS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS10, LPSF/PTS18, LPSF/PTS19, LPSF/PTS23 e LPSF/PTS24 (Anexo 1) foram realizados no LPSF/UFPE pela Profa. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima, Profa. Dra. Marina Galdino da Rocha Pitta e Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta. O quadro 3 descreve resumidamente, código, estrutura, nome e peso molecular dos nove derivados tioxo-imidazolidínicos utilizados nesse estudo.

Quadro 3 – Informações químicas dos novos derivados tioxo-imidazolidínicos.

Código	Ligantes/Radicais	Nome	Peso Molecular
LPSF/PTS2		5-(4-piperidin-1-il-benzilideno)-3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona	429,1
LPSF/PTS4		5-(4-benzilóxi-benzilideno)-3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona	452,0
LPSF/PTS5	3,4-dibenzilóxi	5-(3,4-dibenzilóxi-benzilideno)-3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona	558,1
LPSF/PTS6		5-(piridin-3-il-(benzilideno)-3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona	423,8
LPSF/PTS10	4-N(CH ₃) ₂	5-(4-dimetilamina-benzilideno)-3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona	389,0
LPSF/PTS18	4-NO ₂	5-(4-nitro-benzilideno)-3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona	391,8
LPSF/PTS19	3-NO ₂	5-(3-nitro-benzilideno)-3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona	391,8
LPSF/PTS23	2,4,6-OCH ₃	5-(2, 4, 6 trimetóxi-benzilideno)-3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona	436,07
LPSF/PTS24	2-Cl,5-NO ₂	5-(2-cloro-5-nitro-benzilideno)-3-(2-cloro-6-flúor-benzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona	424,9

4.3. CITOTOXICIDADE DOS DERIVADOS TIOXO-IMIDAZOLIDÍNICOS

4.3.1. Teste em Células Mononucleares do Sangue Periférico

Voluntários saudáveis: amostras de sangue periférico foram obtidas a partir de voluntários saudáveis, sem ingerir álcool e ter tomado qualquer tipo de medicação ($n = 10$), de ambos os gêneros, com idade variando entre 18 e 25 anos, após autorização do Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde da UFPE, protocolo de aprovação: 483/10 e 57/10 (Anexo 2). O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi assinado por todos os doadores que participaram da pesquisa (Anexo 3). As Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) foram isoladas por centrifugação em Ficoll Paque™ Plus (densidade 1,077 g/mL -ge Healthcare Bio-Sciences). Em seguida, as CMSP foram ressuspensas em meio *Roswell Memorial Park Institute* (RPMI) 1640 (Gibco) suplementado com L-glutamina, 10% de soro fetal de bovino (Gibco), HEPES 10 mM (4 (2-hidroxietil) -1-piperazinoetanossulfônico) (Gibco) e 200 U/mL de penicilina/estreptomicina (Gibco). A viabilidade celular foi determinada por exclusão do azul de trypan 0,4% (Sigma-Aldrich, EUA) 1: 4 (1 parte de células: 4 partes do corante). As amostras foram utilizadas apenas quando a viabilidade foi superior a 98% (PEREIRA et al., 2014).

Na avaliação da citotoxicidade das substâncias tioxo-imidazolidínicas, utilizou-se o Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolium (MTT), um composto hidrossolúvel, que em solução apresenta coloração amarelo-pálido e é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto em suas mitocôndrias pelas desidrogenases. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em formazana, um composto de coloração azul-escuro, não solúvel em água e fica precipitado no citoplasma celular. O ensaio colorimétrico com MTT mede a quantidade de formazana formado através de espectrofotometria e é sensível e quantitativo, já que o valor da absorbância é proporcional ao número de células viáveis.

Para o procedimento deste ensaio, CMSP foram mantidas em placas de 96 poços em uma densidade de 1×10^5 células/poço. Em alguns poços, as células foram mantidas em contato com as substâncias testadas (LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS10, LPSF/PTS18, LPSF/PTS19, LPSF/PTS23 e LPSF/PTS24) em diferentes concentrações (1, 10 e 100 μ M) e em outros, nenhuma substância foi adicionada (grupo controle), permanecendo por 48h a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, e no final da incubação as células foram centrifugadas, e o meio foi substituído por meio sem o composto (150 μ L) contendo MTT (0,5 mg/mL). Três horas mais tarde, o formazan MTT foi diluído

com 100 µL de *Sodium Dodecyl Sulfate* (SDS) a 20%, e a sua absorbância foi medida (570 nm), em aparelho (Biotek EL808). A atividade citotóxica foi quantificada como a percentagem de controle de absorbância (SILVA et al., 2014). Os resultados foram analisados comparando a absorbância dos poços tratados com os controles celulares. Os valores obtidos foram representativos de uma média de três experimentos realizados.

4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA

4.4.1. Parasitos

A cepa LE (Luiz Evangelista) de *S. mansoni* é rotineiramente mantida por passagens em série em caramujos *B. glabrata* e camundongos *Swiss webster* no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz.

4.4.2. Animais

Foram usados na parte experimental camundongos *S. webster*, fêmeas, com aproximadamente um mês de idade pesando em média 30g, nascidos e criados no biotério do CPqAM – FIOCRUZ/PE. Os animais foram mantidos em gaiolas devidamente identificadas e alimentados com ração comercial e água potável. As cercarias de *S. mansoni*, cepa LE, usadas para infecção, foram fornecidas pelo Moluscário do CPqAM – FIOCRUZ/PE, onde o ciclo é mantido utilizando-se o modelo *B. glabrata* – camundongo – *B. glabrata*. A utilização desses animais no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CPqAM/FIOCRUZ/PE, sob licença nº 06/2010 (Anexo 4).

4.4.3. Caramujos

Os caramujos foram mantidos em laboratório dentro de um aquário com água corrente, boa oxigenação, apresentando pH entre 7,2 a 7,8 e isenta de cloro, cobre ou zinco, que dificultam a sobrevivência dos mesmos. A espécie *B. glabrata* foi a utilizada para infecção por *S. mansoni* em laboratório.

4.4.4. Infecção e exame dos caramujos

A infecção desses moluscos, como rotina, foi feita com 10 miracídios de *S. mansoni* por caramujo, deixando-os juntos por algumas horas. Os caramujos foram transferidos para uma estufa ou sala e mantidos a 28°C. Após 30 dias, examinaram-se os caramujos, colocando-os individualmente em pequenos vidros com água e expostos à luz, quando 60 a 80% dos caramujos estavam eliminando cercarias e os não infectados foram eliminados. Os caramujos infectados viveram em torno de 40 dias.

4.4.5. Infecção dos camundongos

Os caramujos foram expostos à luz por duas horas e o líquido contendo as cercarias foi transferido para um único béquer, originando um pool de cercarias provenientes de caramujos. De cada béquer, foi retirada uma alíquota de, aproximadamente, 0,3mL que foram contadas com auxílio de uma lupa. As alíquotas eram ajustadas, a fim de se obter uma concentração equivalente a mais ou menos 20 ± 5 cercarias, para cada volume de 0,1mL. Os camundongos foram infectados por via percutânea, utilizando cerca de 120 cercarias para os experimentos *in vitro*. Praticamente todos os animais infectaram-se, e a taxa de recuperação girou em torno de 15-20 vermes adultos, 56 dias após a infecção. Para que não houvesse desproporção entre os vermes machos e fêmeas recuperados, foram utilizadas cercarias provenientes de 30 ou mais caramujos infectados (MATOS-ROCHA et al., 2013).

4.4.6. Obtenção de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*

Os vermes adultos do parasito foram obtidos por perfusão murina manual do sistema porta-hepático de camundongos albino *S. webster*, os quais eram infectados e permaneciam por oito semanas. A técnica de perfusão murina manual descrita é utilizada principalmente para recuperação de vermes para cultivo ou para quando é necessário obter vermes com menos lesões, uma vez que essa técnica injeta menor pressão no interior do organismo.

Camundongos com oito semanas de infecção foram sacrificados por “overdose” de pentobarbital sódico 3,0 % (Hypnol - Fontoveter), administrado por via intraperitoneal ($\pm 0,2$ mL). Os vermes adultos de *S. mansoni* foram obtidos através da perfusão retrógrada do fígado, onde se fez a exposição das vísceras abdominais e do coração, a veia porta foi seccionada, na altura dos rins, com o auxílio de uma agulha conectada a uma seringa.

Imediatamente, na parte inferior dos ventrículos do coração foi injetado meio de cultura RPMI – 1640, pH 7,4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) heparinizado (0,016 % = 0,83 UI/mL), obtendo-se assim, os parasitos. Estes foram lavados com meio de cultura RPMI – 1640, contendo 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Gibco Limited, Paisley, Scotland).

4.4.7. Avaliação da mortalidade *in vitro*

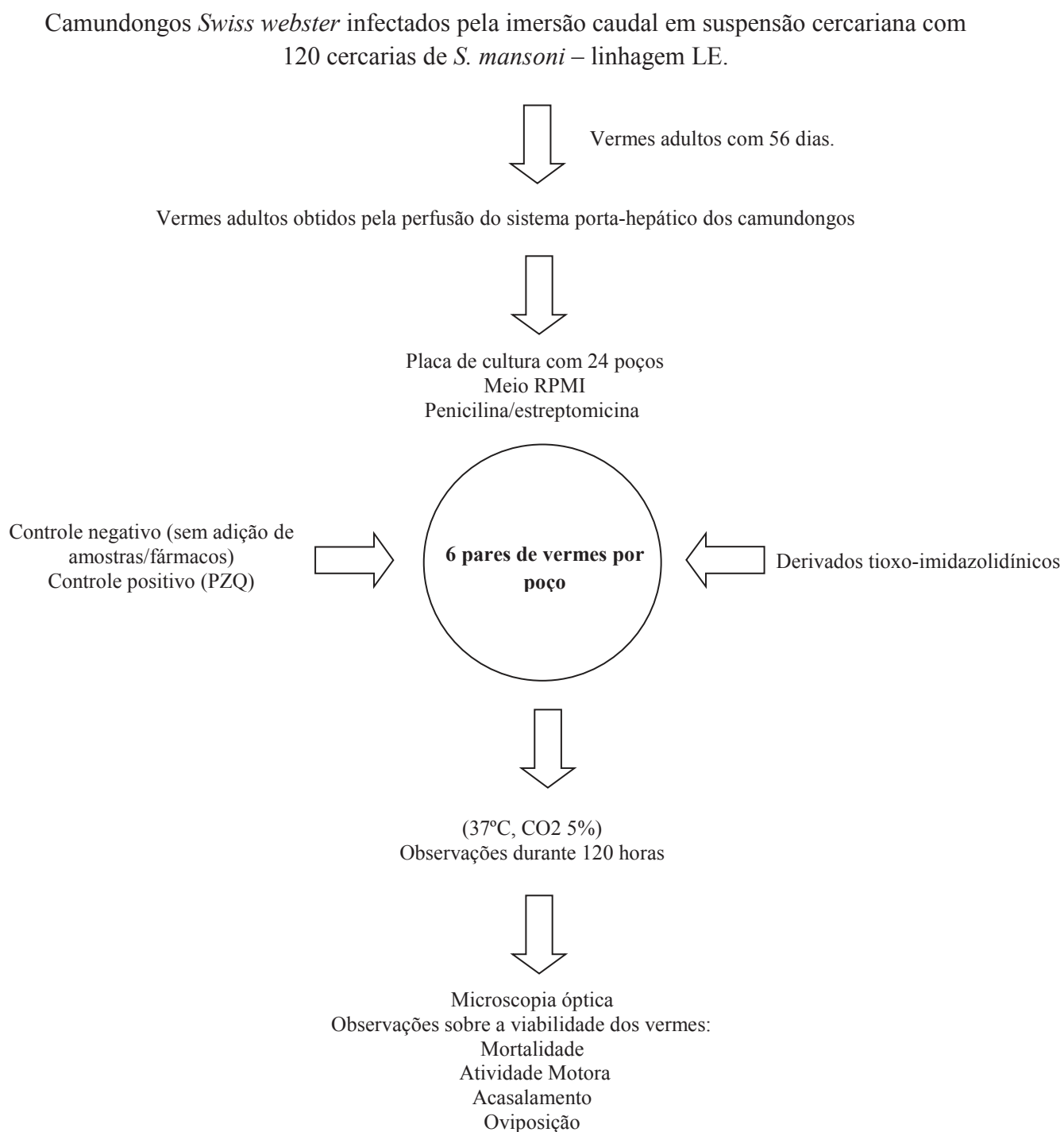
Na realização do experimento, após os vermes serem transferidos para as placas de cultura, foi acrescido RPMI com HEPES 20 mM em pH = 7,5 e suplementado com penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e soro fetal bovino a 10%. Em seguida, seis vermes (machos e fêmeas) foram transferidos para cada poço das placas de cultura de 12 poços de 35 mm de diâmetro contendo 2 mL de meio. Em seguida foram incubados a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de gás carbônico (CO₂).

Para os testes *in vitro* com vermes adultos de *S. mansoni*, os compostos (LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS10, LPSF/PTS18, LPSF/PTS19, LPSF/PTS23 e LPSF/PTS24) foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e adicionados aos poços da placa de cultura, em concentrações que variavam entre 5 a 100 µM. Os vermes foram mantidos durante cinco dias sendo monitorados a cada 24 h para avaliação de mudanças na atividade motora, oviposição, acasalamento e mortalidade (KNOBLOCH; KUNZ; GREVELDING, 2006).

Como controle negativo, vermes adultos foram incubados em meio RPMI 1640 e RPMI 1640 + 1,6% de DMSO. Como controle positivo, vermes foram incubados em 10 µM de PZQ. Todos os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração analisada (XIAO et al., 2001;2002; MAGALHÃES et al., 2009).

A avaliação da viabilidade dos vermes adultos foi baseada em procedimentos padrão para triagem de compostos esquistossomicida, proposto por Horiuchi et al. (2005), onde: (3,0) vermes com atividade normal; (1,5) vermes com menor perda dos movimentos, mas, com atividade da cauda; ventosas e membrana do canal ginecóforo e (0) vermes sem movimentos. A figura 9, apresenta o esquema experimental de avaliação de atividade esquistossomicida *in vitro*.

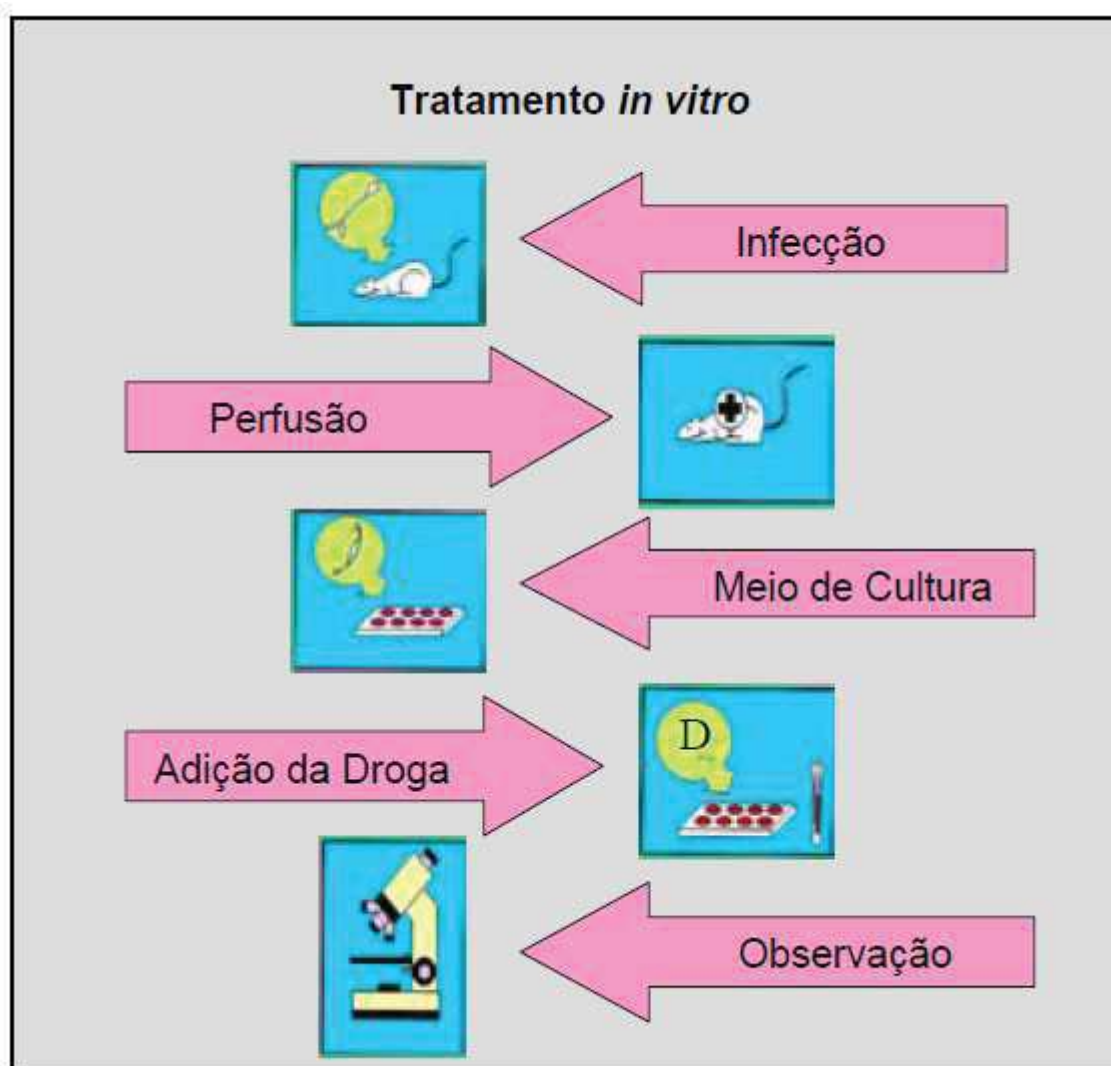
Figura 9 - Esquema experimental de avaliação de atividade esquistossomicida *in vitro*.



Fonte: Adaptado de MORAES, 2011.

Durante as leituras, cada poço foi observado, onde se verificou a viabilidade dos vermes, o grau de mobilidade, acasalamento dos vermes, morfologia, desprendimento de tegumento e presença de ovos nas placas (Figura 10). Ao término do período de observação, os vermes foram considerados mortos quando não foi observado nenhum movimento após 3 minutos de observação através de microscópio invertido (MATOS-ROCHA et al., 2013).

Figura 10 – Análise da avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro*. (SILVA, 2004)



4.4.8. Avaliação das alterações tegumentares

Para avaliação das alterações tegumentares, foi utilizada a técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Assim, vermes adultos de *S. mansoni* sem tratamento e incubados com melhor derivado tioxo-imidazolidínico avaliado *in vitro* foram fixados (glutaraldeído a 2,5%, paraformaldeído a 4% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,4) por 12 horas em temperatura ambiente, lavadas 3 vezes a cada 10 minutos no mesmo tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7,2 por 1 hora. Após esta etapa, o material foi lavado três vezes a cada 10 minutos no mesmo tampão, desidratado em séries crescentes de etanol (30%, 50%, 70%, 90% e 100%) e posteriormente as amostras foram para o ponto crítico. Após a montagem e metalização, o material foi observado no MEV JEOL–JSM 5600LV (SANTIAGO et al., 2014).

ARTIGO 1

SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF NOVEL IMIDAZOLIDINE DERIVATIVES AS CANDIDATE SCHISTOSOMICIDAL AGENTS

Thiago José MATOS-ROCHA, Maria do Carmo Alves de LIMA, Anekécia Lauro da SILVA, Allana Lemos Andrade GOUVEIA, Vinícius Barros Ribeiro da SILVA, Antônio Sérgio Alves de ALMEIDA JÚNIOR, Fábio André BRAYNER, Pablo Ramon Gualberto CARDOSO, Marina da Rocha PITTA-GALDINO, Ivan da Rocha PITTA, Moacyr Jesus Barreto de Melo RÊGO, Luiz Carlos ALVES and Maira Galdino da Rocha PITTA

JOURNAL OF THE SÃO PAULO INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE



SYNTHESIS AND BIOLOGICAL EVALUATION OF NOVEL IMIDAZOLIDINE DERIVATIVES AS CANDIDATE SCHISTOSOMICIDAL AGENTS

Thiago José MATOS-ROCHA (1,3,4), Maria do Carmo Alves de LIMA (2), Anekécia Lauro da SILVA (2), Jamerson Ferreira de OLIVEIRA (2), Allana Lemos Andrade GOUVEIA (2), Vinícius Barros Ribeiro da SILVA (2), Antônio Sérgio Alves de ALMEIDA JÚNIOR (2), Fábio André BRAYNER (1,3), Pablo Ramon Gualberto CARDOSO (4), Marina da Rocha PITTA-GALDINO (2), Ivan da Rocha PITTA (2), Moacyr Jesus Barreto de Melo RÊGO (4), Luiz Carlos ALVES (1,3) and Maira Galdino da Rocha PITTA (4)

(1) Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ/PE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-420 Recife, PE, Brasil.

(2) Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF), Núcleo de pesquisas em inovação terapêutica (NUPIT), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Brasil.

(3) Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brasil.

(4) Laboratório de Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas (LINAT), Núcleo de pesquisas em inovação terapêutica (NUPIT), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) Rua Thereza Amélia s/n, Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Brasil.

SUMMARY

Introduction: Schistosomiasis is an infectious parasitic disease caused by trematode *Schistosoma mansoni*, which threatens approximately 207 million people worldwide and its control is dependent on a single drug, praziquantel. The aim of this study was to evaluate the anti-*Schistosoma mansoni* activity *in vitro* of novel imidazolidines derivatives. **Material and methods:** We synthesis three novel imidazolidines derivatives: (LPSF/PTS24) (Z)-4-(2-chloro-5-nitro-benzylidene)-1-(2-chloro-6-fluoro-benzyl)-5-thioxo-imidazolidin-2-one; (LPSF/PTS10) (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-dimethylaminobenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one and (LPSF/PTS23) (Z)-1-(2-chloro-6-fluoro-benzyl)-5-thioxo-4-(2,4,6-trimethoxy-benzylidene)-imidazolidin-2-one. The structures of these compounds were determined by spectroscopic methods. During the biological assays parameters such as motility, oviposition, mortality and analysis of Scanning Electron Microscopy were evaluated. **Results:** LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23 were considered to be active in the separation of coupled pairs, mortality, decrease in the motor activity, while LPSF/PTS24 only caused mortality of worms with 120 h of incubation. Beside that results revealed that LPSF/PTS23 induced ultrastructural alterations in worms, after 24 h of contact, causing extensive erosion over the entire body of the worms. **Conclusion:** In conclusion, the imidazolidinic derivatives which presents the trimethoxy and benzylidene halogens showed a promising *in vitro* schistosomicidal activity.

KEYWORDS: *Schistosoma mansoni*; Imidazolidines; Ultraestructure.

INTRODUCTION

Parasitic diseases remain obstacles to socioeconomic development in poor countries. Schistosomiasis (an infection caused by trematode worms of the genus *Schistosoma*) is the second most significant parasitic disease in the world after malaria. It is a chronic and debilitating disease that continues to threaten millions of people, particularly the rural poor in the developing world¹.

The major etiological agent of human schistosomiasis is *Schistosoma mansoni*, and it is estimated that more than 200 million people are infected². Approximately 779 million

people are at risk for schistosomiasis, with 207 million infected in 76 countries and territories³.

The reference drug for treatment of schistosomiasis is praziquantel (PZQ) (2-cyclohexylcarbonyl-1,2,3,6,7,11b-hexa-hydro-4*H*-pyrazino{2,1-*a*}isoquinoline-4-one)⁴.

Recent reports of resistance in some strains have worried the world's public health organizations⁵. In this context, the identification of new and effective schistosomicidal compounds is essential⁶.

At present, various research groups are dedicating themselves to identifying new schistosomacide agents obtained from natural⁷⁻⁸ and synthetic sources⁹. The importance of heterocyclic compounds as potential agents against several parasitic diseases, caused by protozoa and helminths, is well known. The five rings have great relevance due to a variety of drug derivatives containing this nucleus, like metronidazole and benzonidazole¹⁰.

The imidazolidines are a broad class of bioactive compounds that also have schistosomacide properties. Niridazole, 1-(5-nitrothiazol-2yl)imidazolidin-2-one, the drug used in the last century, has been widely used for clinical purposes¹¹. This drug received considerable attention, probably because it was one of the early treatment options to be administered orally¹².

Imidazolidines have antifungal, antimicrobial and leishmanicidal¹³, anti-*Trypanosoma cruzi*¹⁴ and schistosomicidal properties¹⁵. The schistosomicidal activity of imidazolidine derivatives have been demonstrated by *in vitro* studies with adult *S. mansoni* worms¹⁶⁻¹⁷. However, as for PZQ, the mechanism of action of the imidazolidines has not been fully elucidated yet¹⁶⁻¹⁷.

The molecular modification of imidazolidines by bioisosteric replacement produces a biological response. This study evaluated the biological activity of imidazolidine derivatives

with different substituent groups by determining their *in vitro* viability against adult worms of *S. mansoni*^{6,9,15}.

Given the results of the imidazolidine derivatives observed so far and due to the great need for a more effective drug, this study aimed to check the antischistosomal potential of the three novel imidazolidinic compounds (LPSF/PTS24) (Z)-4-(2-chloro-5-nitrobenzylidene)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxoimidazolidin-2-one; (LPSF/PTS10) (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-dimethyl aminobenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one and (LPSF/PTS23) (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxo-4-(2,4,6-trimethoxybenzylidene)imidazolidin-2-one, through an *in vitro* activity evaluation and an ultrastructural investigation of the parasite, and to analyze the cytotoxicity of the tested compound in a PBMCs.

MATERIALS AND METHODS

Compound: The compounds (LPSF/PTS24)-(Z)-4-(2-chloro-5-nitrobenzylidene)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxoimidazolidin-2-one; LPSF/PTS10)-(Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-dimethyl aminobenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one and (LPSF/PTS23)-(Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxo-4-(2,4,6-trimethoxybenzylidene)imidazolidin-2-one were obtained from Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos at Universidade Federal de Pernambuco (Brazil) and was duly identified by nuclear magnetic resonance of hydrogen, infrared (IR) and mass spectroscopy (MS).

The scheme 1 displays the synthetic route of the three derivatives. The starting reagent was imidazolidine-2,4-dione (1) which was reacted with 2-chloro-6-fluorobenzyl chloride under basic conditions to obtain the intermediate 3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)imidazolidine-2,4-dione as previously described (2)¹⁸. After that, the reaction of 3-(2-chloro-6-

fluorobenzyl)imidazolidine-2,4-dione (2) with Lawesson's reagent in anhydrous dioxane gave the novel compound 1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxoimidazolidin-2-one (3) according to the protocol used by Gouveia et al¹⁹. The reaction mixture was heated under reflux for 24 hours. Confirming the reaction occurred through the mass spectrometer where it was shown that the compound 2 m/z ($M + H$)⁺ = 243.035 became the compound 3 m/z ($M + H$)⁺ = 259.013 by changing the oxygen atom in the sulfur in the structure. Then 2-cyano-3-phenyl-acrylic acid ethyl esters derivatives were synthesised through Knoevenagel condensation between 2-chloro-5-nitrobenzaldehyde or 4-dimethylaminobenzaldehyde or 2,4,6-trimethoxybenzaldehyde and ethyl cyanoacetate²⁰. A Michael-type addition was then performed by reacting the ester derivatives with the intermediate 1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxoimidazolidin-2-one (3) to form the final compounds (LPSF/PTS24; LPSF/PTS10; LPSF/PTS23).

Reactions were monitored with analytical thin-layer chromatography in silica gel 60 F254 plates and visualized under UV light (254nm). Melting points were determined on a Quimis 340 capillary melting point apparatus and were not corrected. Infrared spectra were recorded as KBr discs using a BRUKER (IFS66) infrared spectrophotometer. Nuclear magnetic resonance ¹H NMR spectra were recorded in a VMMRS 300 MHz and 400 MHz VARIAN spectrometer using tetramethylsilane (TMS) as the internal standard and DMSO-*d*₆ as the solvent.

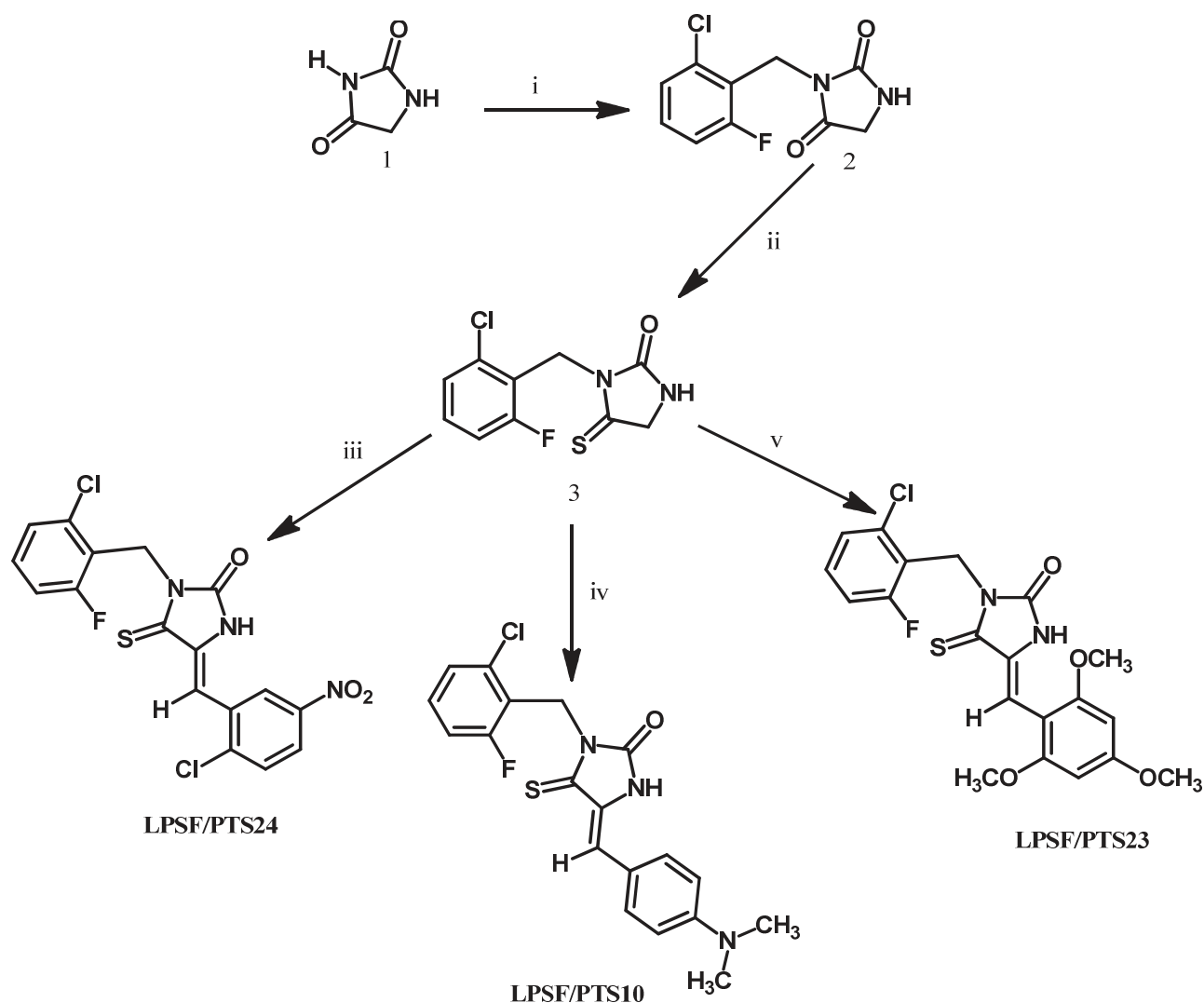
Chemical shifts (δ , ppm) were assigned according to the internal standard signal of TMS in DMSO- *d*₆ (δ , ppm). Coupling constants (*J*) are reported in Hz. ¹H NMR spectra are reported in the following order: chemical shift, multiplicity, number and type of proton and coupling constant(s). Mass spectra with MALDI-TOF Autoflex III (Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA). Laser Nd: YAG, 355 nm. Freq. laser: 100 Hz. The derivatives (LPSF/PTS24; LPSF/PTS10; LPSF/PTS23) were isolated as a single isomer. X-ray

crystallographic studies and ^{13}C NMR have demonstrated a preferred *Z* configuration for 5-benzylidene-thiazolidinones²¹⁻²⁵.

The presence of the arylidene proton peak in ^1H NMR for the synthesized derivatives (LPSF/PTS24; LPSF/PTS10; LPSF/PTS23) confirmed the completion of the nucleophilic addition reaction. The compounds were also confirmed by MS data in negative mode.

The IR spectrum of the compound showed characteristic peaks of the thiocarbonyl group and arylidene, confirming the formation of derivatives 5-thioxoimidazolidin-2-one. For the preparation of compounds, equimolar amounts of 1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxoimidazolidin-2-one (3) (200mg) and 2-cyano-3-phenylacrylic acid ethyl ester (165 mg) were reacted using absolute ethanol (8 mL) as the solvent and morpholine (1 mL) as the catalyst.

The reaction mixture was heated to 50 °C for 8 hours and then cooled to room temperature. The solid that precipitated out was filtered under vacuum and washed with water and absolute ethanol.



Scheme 1 - Reagents and conditions: (i) 2-chloro-6-fluorobenzyl chloride; CH₃OH, NaOH, 60° C (ii) Lawesson's reagent, 90 °C (iii) 2-cyano-3-(2-chloro-5-nitrophenyl)acrylic acid ethyl ester, CH₃CH₂OH, 50° C; (iv) 2-cyano-3-(4-dimethylaminophenyl)acrylic acid ethyl ester, CH₃CH₂OH, 50 °C; (v) 2-cyano-3-(2,4,6-trimethoxy-phenyl)acrylic acid ethyl ester, CH₃CH₂OH, 50 °C.

Ethical approval: Ethics approval was obtained from ethical committee from Health Science Center of Federal University of Pernambuco and Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (protocols 483/10 and 57/10 respectively). All experiments were authorized by the Committee for Ethics in Animal Care of Foundation Oswaldo Cruz, in accordance with nationally and internationally accepted principles for laboratory animal use and care (CEUA/FIOCRUZ), approval number: 06/2010.

Determination of cytotoxicity: Peripheral blood mononuclear cells were obtained from heparinized blood from healthy, nonsmoking donors who had not taken any drugs for at least

15 days prior to sample collection (10 volunteers), and the cells were isolated via a standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll Hypaque solution (GE Healthcare). Cells were counted in a Neubauer chamber, and viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were used only when the viability was 98 %. All donors gave informed consent, and the study was approved by the Human Research Ethics Committee of UFPE in the Health Sciences Center (CEP/CCS/UFPE N0 483/10 and 57/10). Cells were plated in 96-well plates (10^6 cells/well). After 24 h, the test compound was added (1, 10 and 100 μ M), and the cells were incubated for 48 h and then subjected to the MTT assay as described.

Then cytotoxicity was quantified by the ability of living cells to reduce MTT to a purple compound. The compounds were tested in three independent assays, and at the end of incubation wells were centrifuged, and the medium was replaced by medium without compound (150 μ L) containing MTT (0.5 mg/mL). Three hours later the MTT formazan was diluted with 100 μ L of 20% SDS, and its absorbance was measured (570 nm) by the apparatus (BioTek EL808). The cytotoxic activity was quantitated in relation to percentage of vehicle treated control absorbance. In this sense, the absorbance of the LPSF/PTS10, LPSF/PTS23 and LPSF/PTS24 treated group was obtained in relation to vehicle treated control group. In all analyzed experiments, the vehicle (DMSO 0.1%) treated group presented viability >98% compared to cells control without vehicle in three independent assays²⁶.

Antischistosomal evaluation criteria

Parasites: *S. mansoni* (LE strain) worms have been maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and *Swiss webster* mice hosts at the Schistosomiasis Laboratory of the Department of Parasitology, Oswaldo Cruz Institute, (Pernambuco, Brazil). Female *S. webster*, weighting 28-30g. Each mouse was exposed to around 120 cercariae. After 8 weeks, adults *S. mansoni* specimens were recovered from the mice by perfusion with RPMI 1640

medium supplemented with heparin. The worms were washed in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ of streptomycin, 100 UI.mL^{-1} of penicillin (Invitrogen), and 25 mM of Hepes. Pairs of adult worms (male and female) were incubated in a 24-well culture plate (Techno Plastic Products, TPP) containing 2 mL of the same medium supplemented with 10% heat-inactivated calf serum at 37 °C in a 5% CO_2 atmosphere, in three independent assays²⁷.

Motility and survival: An inverted microscope and a stereomicroscope were used to evaluate the motility and survival of worms monitored at 24, 48, 72, 96 and 120 h of incubation. Motility and survival of worms were assessed according to the criteria scored in a viability scale of 0-3. The scoring system was as follows: 3, complete body movement; 1.5, partial body movement or immobile but alive; and 0, dead, at least three independent assays²⁸.

In Vitro Studies with *S. mansoni*. For the *in vitro* test with *S. mansoni*, LPSF/PTS10, LPSF/PTS23 and LPSF/PTS24 imidazolidines derivatives were dissolved in 1.6% dimethyl sulphoxide (DMSO) and used in concentrations varying from 5 to 100 μM , which were added to the medium containing the worms after a period of 2 h of adaptation to the culture medium. In the positive control group the adult worms of *S. mansoni* were incubated in the presence of PZQ, triplicates were carried out for each concentration used.

The parasites were kept for 5 days and monitored every 24 h to evaluate their general condition: motor activity, alterations in the tegument, and mortality rate. The control worms were treated with 1.6% DMSO in an RPMI 1640 medium. The worms were considered dead when there was no motion detected after 3 minutes of observation²⁹.

RESULTS

Compound: (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-(dimethylaminobenzylidene)-5-thioxo imidazolidin-2-one (LPSF/PTS10): The product was an orange solid. Formula: $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{ClFN}_3\text{OS}$; M.W.: 389.8742 g/moles; Yield: 45%; Melting point: 269 – 270° C; R_f : 0.55

(*n*-hexane/AcOEt 6:4); ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 3.00 (s, 6H, $\text{H}_3\text{C-N}$); 5.15 (s, 2H, CH_2); 6.72 (d, 2H, H-Ar, $J = 9.2$ Hz); 7.57 (d, 2H, H-Ar, $J = 8.8$ Hz); 6.95 (s, 1H, CH=); 7.33 (m, 2H, CH-Ar, benzyl); 7.17 (t, 1H, CH-Ar, benzyl, $J = 8.8$ Hz); 11.00 (s, 1H, NH). IR (KBr, cm^{-1}): 3226.68; 1725.22; 1588.95; 1531.52. MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: calculated= 390.07; found= 390.00.

(*Z*)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxo-4-(2,4,6-trimethoxybenzylidene)imidazolidin-2-one (LPSF/PTS23): The product was an orange solid. Formula: $\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{ClFN}_2\text{O}_4\text{S}$; M.W.: 436.8843 g/moles; Yield: 55%; Melting point: 152-153° C; R_f : 0.40 (*n*-hexane/AcOEt 6:4); ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 3.80 9 (s, 6H, OCH_3); 3.83 (s, 3H, OCH_3); 5.13 (s, 2H, CH_2); 6.26 (s, 2H, CH-Ar); 6.99 (s, 1H, CH=); 7.18 (t, 1H, CH-benzyl, $J = 8.1$ Hz); 7.34 (m, 2H, CH- benzyl); 10.08 (s, 1H, NH). IR (KBr, cm^{-1}): 3413.59; 1747.92; 1598.88; 1510.63. MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: calculated= 437.06; found= 437.00.

(*Z*)-4-(2-chloro-5-nitrobenzylidene)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-5-thioxoimidazolidin-2-one (LPSF/PTS24): The product was an orange solid. Formula: $\text{C}_{17}\text{H}_{10}\text{ClFN}_3\text{O}_3\text{S}$; M.W.: 424.2490 g/moles; Yield: 66%; Melting point: 244 – 246° C; R_f : 0.75 (*n*-hexane/AcOEt 6:4); ^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): δ 5.17 (s, 2H, CH_2); 6.95(s, 1H, CH=); 7.20(t, 1H, CH-Ar, benzyl, $J = 8.8$ Hz); 7.37 (m, 2H, CH-Ar, benzyl); 7.83 (d, 1H, CH-Ar, $J = 8.7$ Hz); 8.19 (d, 1H, CH-Ar, $J = 8.7$ Hz); 8.39 (s, 1H, CH-Ar); 11.69 (s, 1H, NH). IR (KBr, cm^{-1}): 3416.55; 1745.92; 1588.88; 1512.56. MS $[\text{M}+\text{H}]^+$: calculated= 425.98; found= 426.00.

Schistosomicidal activity: Currently, the imidazolidines are being investigated for their schistosomicidal activity. In schistosomiasis, imidazolidines composites have shown action against adult worms *S. mansoni* ³⁰⁻³².

Initially, we performed cell viability tests with the newly synthesized compounds. Many techniques are utilized to elucidate cytotoxic mechanisms induced by drugs in different cells. The present study used evaluate *in vitro* on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Our results show that compounds LPSF/PTS10, LPSF/PTS23 and LPSF/PTS24, present no toxic effects at different concentrations ranging from 5–100 μ M (Table 1).

Compounds were evaluated at a concentration of 5 to 100 μ M every 24 h for a period of 120 h, and mortality, motility, and alterations in the tegument of the worms were observed. Three derivatives containing the pharmacophoric group imidazolidine ring were tested for schistosomicidal activity. *In vitro* adult worm mortality was observed at different imidazolidine derivative concentrations (Table 1). PZQ was used as the reference schistosomicidal drug.

In the present study, the imidazolidine derivatives LPSF/PTS10, LPSF/PTS23 and LPSF/PTS24 demonstrated activity against adult worms of *S. mansoni*. The evaluation of the *in vitro* susceptibility of *S. mansoni* to the imidazolidine derivative LPSF/PTS23 revealed that the worms were sensitive during the first 24 h, the highest mortality rate occurring after contact at a concentration of 100 μ M. LPSF/PTS10 only caused 100% of death of the parasites at all concentrations after 48h. After 96 h, LPSF/PTS23 showed similar behavior to PZQ and induced 100% mortality at all concentrations.

Adult male and female worms, when treated with LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23 were shown to be sensitive the concentrations used with 100% mortality after 72 h and 24 h of contact, respectively. The maximum effect achieved by LPSF/PTS10 at 40 μ M and 20 μ M was after 48 and 72 h, respectively. LPSF/PTS24 took the longest time to cause the death of the worms with a 50% mortality of the worms at 100 μ M and only 25% at a concentration at 20 μ M at the end of 120 hours of incubation.

The compounds LPSF/PTS10, LPSF/PTS23 and LPSF/PTS24 at a concentration of 5 μ M had no effect on parasite mortality, PZQ induced 100% mortality of adult worms.

In all the experiments, the control group remained viable throughout the observation period and was submitted only to the vehicle used to dissolve the different compounds. LPSF/PTS23 exhibited the best schistosomicidal properties in relation to other compounds, with 100% mortality within 24 h the concentrations.

The table 2 shows the motility score of *S. mansoni*. During all observation period (24, 48, 72, 96 and 120 h) the negative control group displayed peristaltic movements and characteristic waves throughout the whole body, suckers in constant movement and occasionally adhering to the bottom of the culture plate (score = 3). The PZQ caused loss of motility in worms leaving them shortened, this effect persisted and became stronger with the passing of time (score=0).

After 24 h of exposure to LPSF/PTS23 and 48 h to LPSF/PTS10 at concentration of 100 μ M, 100% of the worms has lost movement completely, being then considered dead (score = 0). After 24 h of exposure to LPSF/PTS24 with 100 μ M, 50% of the worms has lost partial body movement (score 1.5).

LPSF/PTS24, in the concentrations of 5 μ M, did not alter the motility of *S. mansoni* in observation intervals 96 h (score=3). On the other hand, after 120 h, 25% of worms displayed a reduction in motility. In the concentrations of 20 and 40 μ M, alter the motility of *S. mansoni* in observation intervals 96 h (score=1.5) and 50% of worms exposed to LPSF/PTS24, in the concentration of 40 μ M, displayed an alteration in motility of *S. mansoni* (score 1.5) in observation intervals 120 h. On the other hand, after 96 h, 75% of worms exposed to 100 μ M displayed a reduction in motility with impairment of peristaltic movement and of the adhesion capacity of their suckers to the bottom of the culture plates (score = 1.5), and after 120 h, 50% of the worms were dead (score = 0).

LPSF/PTS10 and LPSF/PTS24, at the concentration of 5 μ M, did not alter the motility of *S. mansoni* in observation intervals. On the other hand, after 96 h, 25% of worms exposed to 5 μ M of LPSF/PTS23 displayed a reduction in motility with impairment of peristaltic movement and of the adhesion capacity of their suckers to the bottom of the culture plates (score 1.5).

In the control, the parasite tegument was observed with oral and ventral suckers, and tubercles and spines in normal state at 120 h of incubation, respectively (Fig. 1A-B). Severe damage of the tegument was observed in worms incubation with PZQ, a contraction and rupture of blisters. The emergence of several holes in the place where the blisters had been located, and loss of spines was observed (Fig. 1C).

The ultrastructural changes in adult schistosomes caused by LPSFPTS23 were characterized by extensive erosion over the entire body of the worms (Fig. 1D); After 48 h, multiple bubbles and projections (solid arrows) emerging from the interior of damaged tubercles (Fig. 1E); After 72 h, tegument erosion can be visualized at higher magnification (Fig. 1F); After 96 h, some tubercles lack their spines (dashed arrow) (Fig. 1G). Damaged tubercles and bubbles present inside the lesion, as observed after 120 h of drug exposition (Fig. 1H).

DISCUSSION

Schistosomiasis is a neglected disease that has one drug of choice, PZQ³³. Because of this, the Special Program for Research and Training in Tropical Diseases promoted by WHO provides opportunities for studies in the development of new anti-*Schistosoma* drugs³⁴ and encourages worldwide synthesis of new compounds for these neglected diseases¹⁰.

Imidazolidines derivatives are being investigated for their anti-parasitic activity³⁰⁻³². The main activities assigned to imidazolidines are antibacterial and anti-*L. amazonensis*¹³,

anti-*T. cruzi*¹² and anti-*S. mansoni*^{6,9,30-32}. Among the various schistosomicidal compounds already tested, the imidazolidine derivatives are well known for their activity in several works that are studying their *in vitro* and *in vivo* efficacy, showing promising results when compared to PZQ, a control drug available in the market for the treatment of schistosomiasis³⁵⁻³⁶.

Many drugs have been compared with PZQ and their cytotoxicity and ability to kill adult worms of *S. mansoni* has been shown as similar to PZQ^{30-32,37}. LPSF/PTS10, LPSF/PTS23 and LPSF/PTS24 were less cytotoxic. LPSF/PTS23 exhibited the best schistosomicidal properties in relation to other compounds, with 100% mortality within 120 h at concentrations of 5–100 µM. These results suggest that the efficacy varies according to the substituent in the 4-position of the imidazolidine group. The compound LPSF/PTS23 has a methoxyl group attached in the 2,4,6-position of the imidazoline ring. The literature findings, it was also showed that heterocyclic compounds containing a methoxyl group exhibited higher schistosomicidal activity than compounds without this group³⁸.

Oviposition by adult worms was also not observed at any concentration of these imidazolidines while in the control group (untreated worms) oviposition was observed and the worms remained viable during the entire observation period. These same physiological alterations seen here were observed in adult worms treated with imidazolidine derivatives in other studies realized by our group (Silva et al.¹¹⁻³²). For example, similar results were achieved by Neves et al.³⁰ and Neves et al.³¹ using 1-(4-chlorobenzyl)-4-[(4-fluorophenyl)hydrazono]-5-thioxoimidazolidin-2-one (LPSF/PT11) and 5-(4-fluorobenzylidene-3-(4-nitrobenzyl)-4-thioxoimidazolidin-2-one (LPSF/RSZ05).

The tegument of *S. mansoni* is an important structure involved in the absorption of nutrients, in secretion of some products, variety of movements, including rapid shortening and extension of the body, typical wavy and peristaltic movement along the body anterior and

posterior axis³⁹. Therefore, the worm's tegument is the critical target for imidazolidine derivatives, as it has been other schistosomicidal activity drugs studied^{6,11, 30-32, 37}.

To test this hypothesis, we first established the concentration of LPSF/PTS23 that is capable of altering the motility, causing death of worms in the period of a 120 h exposure *in vitro*. Based on these criteria, through SEM, changes in the surface of the tegument of *S. mansoni* adult worms⁴⁰. Thus, we contribute with other studies that show ultrastructural analysis of imidazolidine derivatives induced surface membrane damage in adult worms of *S. mansoni*^{6,11,30-32,37,41}.

However, despite its effect on motor activity, the exact mechanisms by which LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23 causes mortality in adult worms remain unclear. On the other hand, some imidazolidine derivatives show toxicity to cells^{6,11,30-32,37,41}. There is evidence that these compounds act at the levels of the cholinergic receptors⁴²⁻⁴³.

Silva et al.³² evaluated the potential of the schistosomicidal the imidazolidinic derivative 3 (5*Z*)-3-(4- bromobenzyl)-5-(4-chlorobenzylidene)-4-thioxoimidazolidin-2-one, after 24 hours of incubation at a dose of 100µg.mL⁻¹, adult *S. mansoni* worms had a significant opening of the gynecophoral canal, contraction of the head and suckers, collapse of the tubercle with erosion of the tegument and a severe lesion revealing the layer of subtegument tissue. In this case, there was an enormous destruction of the subtegument surface.

Acetylcholinesterase is also found on the tegumental surface of the worm and has the function of obtaining glucose³³, but there is already evidence showing that this contraction is due to calcium influx which also causes contraction of the muscle fibers. Since this enzyme is inhibited, the absorption of nutrients for the survival of the parasite may be compromised⁴⁴. Imidazolidinic compounds such as (Z)-3-(4-chlorobenzyl)-5-(4-nitrobenzylidene)imidazolidine-2,4-dione, (Z)-3-(4-chloro-benzyl)-5-(4-fluorobenzylidene)-1-

methyl-2-thioxoimidazolidin-4-one and (Z)-5-(4-fluorobenzilidene)-1-methyl-3-(4-phenylbenzyl)-2-thioxoimidazolidin-4-one induced significant changes in the tegumental surface of the body of adult *S. mansoni* worms, causing damage in the tegument with contraction of the body and of oral and ventral suckers, disorganization and total collapse of the tubercles with loss of spines. Thus, the nitro, fluorine and phenyl radicals can justify the good activity of the imidazolidine derivatives mentioned above ⁴⁶.

Promising results with other imidazolidine derivatives presenting chlorine and fluorine radicals in their structure were also able to cause ultrastructural changes in the tegument of adult worms of *S. mansoni*, such as the derivatives 1-benzyl-4-[(4-chlorophenyl)-hydrazono]-5-thioxoimidazolidin-2-one and 1-(4-chlorobenzyl)-4-[(4-fluorophenyl)-hydrazono]-5-thioxoimidazolidin-2-one¹⁵.

Neves et al.³⁰ showed increasing number of the tegument, disruption of the blisters, spine loss and tissue wrinkling after contact with LPSF/PT5 and blisters and swelling of the tegument and loss of a few spines in the tubercles after incubation with LPSF/PT11. In addition, effects of imidazolidine (Z)-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-3-(4-phenyl-benzyl)-2-thioxo-imidazo-lidin-4-one, resulted in severe tegumental damage in male worms *S. mansoni*, including erosion with exposure of internal structures⁴¹. The halogens have the ability to enhance the absorption of the derivatives by the cell membranes⁴⁶. Thus, this may have happened in the tegumental surface of the parasite treated with the above compounds as well as with the LPSF/PTS23 which presents the halogens trimethoxy and benzylidene in its chemical structure.

Regarding changes in the pairing, all pairs of coupled adult worms were separated into individual male and female after incubation with 20, 40 to 100 μ M of compounds LPSF/PTS10 and LPSF/PTS23, while the pairs remained coupled after exposure of compounds LPSF/PTS24 (20 to 100 μ M). Our study reinforced the use of imidazoline

derivatives as drug anti-*S. mansoni*, and identified LPSF/PTS23 as active on adult worms *S. mansoni*.

CONCLUSION

In conclusion, the imidazolidinic derivatives which presents the trimetoxo and benzyldene halogens showed a promising *in vitro* schistosomicidal activity. Thus, it is necessary to investigate the elucidation of the mechanism of action of this compound as well as to invest in further studies to investigate its biological activity such as an *in vivo* evaluation.

ACKNOWLEDGMENTS

Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT-if), Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ/PE) and Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

COMPETING INTERESTS

The authors have declared that no competing interests exist.

CONSENT (WHERE EVER APPLICABLE)

The present study did not involve patients.

ETHICAL APPROVAL (WHERE EVER APPLICABLE)

All authors hereby declare that "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 85-23, revised 1985) were followed, as well as the ethical principles of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL). This project was approved by the

Animal Ethics Committee from Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) and authorized by the license no. 06/2010.

Síntese e avaliação biológica de novos derivados imidazolidínicos candidatos a agentes esquistossomicidas

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica causada pelo trematódeo *Schistosoma mansoni*, que ameaça cerca de 207 milhões de pessoas no mundo e seu controle é dependente de uma única droga, o praziquantel. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-*Schistosoma mansoni in vitro* novos derivados de imidazolidina. Demonstraram-se três novos derivados de imidazolidina: (LPSF / PTS24) (Z) -4- (2-cloro-5-nitro-benzilideno) -1- (2-cloro-6-fluoro-benzil) -5- tioxo-imidazolidin-2-ona; (LPSF/PTS10) (Z) -1- (2-cloro-6-fluoro-benzil) -4- (4- dimetil aminobenzilideno) -5-tioxo-imidazolidin-2-ona e (LPSF/PTS23) (Z) -1- (2-cloro-6-fluoro-benzil) -5-tioxo-4- (2,4,6-trimetoxi-benzilideno)-imidazolidin-2-ona. As estruturas destes compostos foram determinadas por meio de métodos espectroscópicos. Durante os ensaios, parâmetros como a motilidade, oviposição, mortalidade e análise de microscopia eletrônica de varredura foram avaliados. LPSF/PTS10 e LPFS/PTS23 foram considerados ativos na separação ativa de pares acoplados, mortalidade e diminuição da atividade motora, enquanto LPSF/PTS24 só causou mortalidade de vermes com 120 h de incubação. Além disso, os resultados revelaram que LPSF/PTS23 induziu alterações ultraestruturais em vermes, após 24 h de contato, causando erosão extensiva ao longo de todo o corpo dos vermes. Em conclusão, os derivados imidazolidínicos que apresentam os halogênios trimetoxi e benzilideno mostraram uma promissora atividade esquistossomicida *in vitro*.

ETHICAL APPROVAL (WHERE EVER APPLICABLE)

All authors hereby declare that "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 85-23, revised 1985) were followed, as well as the ethical principles of the Brazilian Society of Laboratory Animal Science (SBCAL). This project was approved by the Animal Ethics Committee from Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CPqAM/FIOCRUZ) and authorized by the license no. 06/2010.

Table 1 - Cytotoxicity and *in vitro* effects of LPSF/PTS10, LPSF/PTS23 and LPSF/PTS24 against adult worms of *Schistosoma mansoni*

		Concentration (μ M)					
		100	40	20	5		
Groups	Time (h)	Mortality (%)				Observations (Worms)	Cytotoxicity (μ M) ^a
RPMI 1640	24	-	-	-	-	Paired worms without apparent morphological change, presence of eggs.	-
	48	-	-	-	-		
	72	-	-	-	-		
	96	-	-	-	-		
	120	-	-	-	-		
DMSO 1.6%	24	-	-	-	-	Paired worms without apparent morphological change, presence of eggs.	-
	48	-	-	-	-		
	72	-	-	-	-		
	96	-	-	-	-		
	120	-	-	-	-		
PZQ	24	100	100	100	100	Not paired, no sucker adherence, absence of eggs, tegument morphology altered	> 100
	48	100	100	100	100		
	72	100	100	100	100		
	96	100	100	100	100		
	120	100	100	100	100		
LPSF/PTS10	24	100	-	-	-	Unpaired, no sucker adherence, absence of eggs tegument morphology altered	> 100
	48	100	100	-	-		
	72	100	100	100	-		
	96	100	100	100	-		
	120	100	100	100	-		
LPSF/PTS23	24	100	100	100	-	Unpaired, no sucker adherence, absence of eggs tegument morphology altered	> 100
	48	100	100	100	-		
	72	100	100	100	-		
	96	100	100	100	-		
	120	100	100	100	25		
LPSF/PTS24	24	-	-	-	-	Paired adult worms without apparent morphological change, presence of eggs	> 100
	48	-	-	-	-		
	72	-	-	-	-		
	96	-	-	-	-		
	120	50	40	25	-		

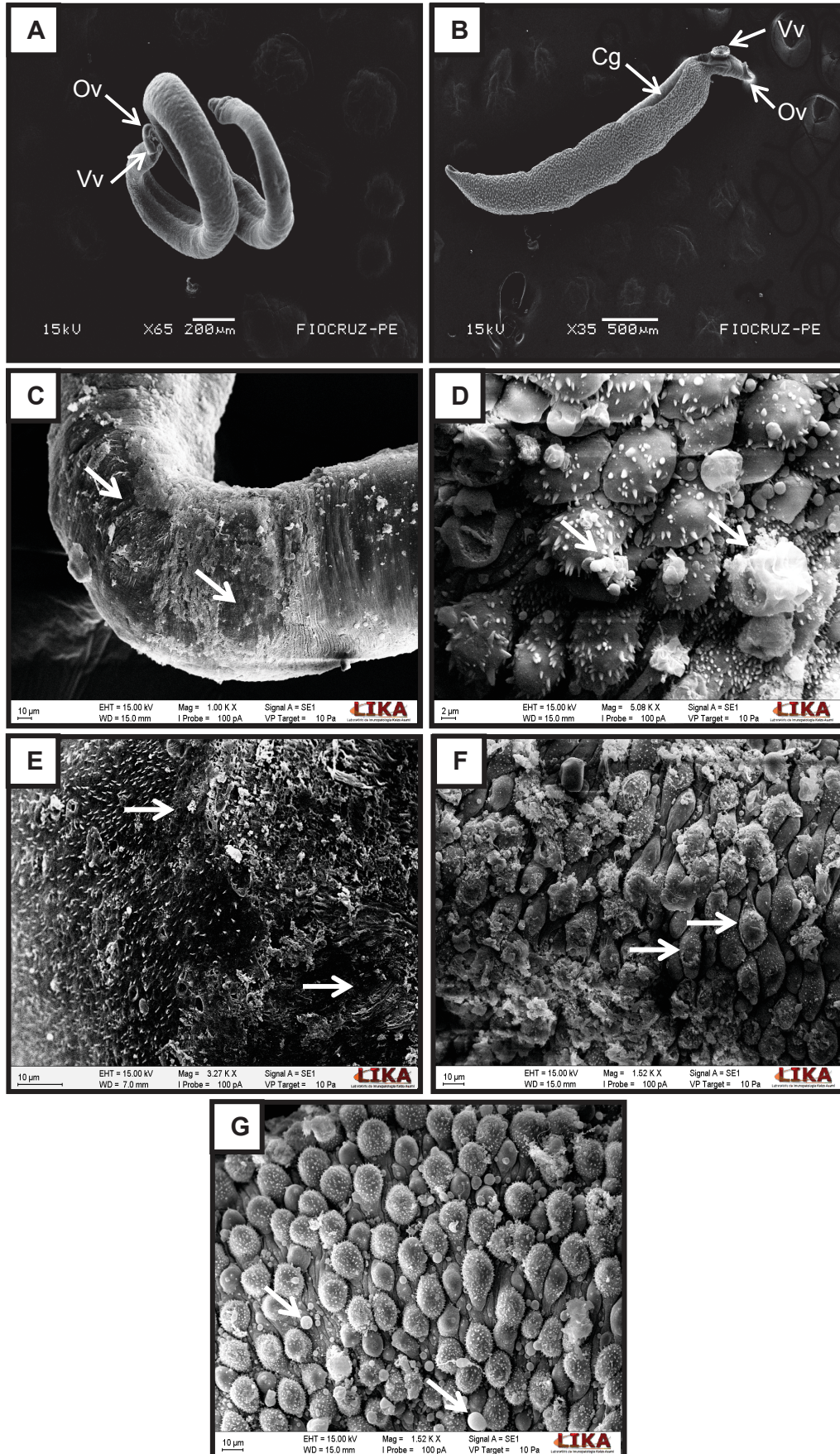
^a Calculated at three concentrations using data obtained from at least three independent experiments, with a SD less than 10% in all cases. The highest nontoxic concentration on PBMCs.

Table 2 – Motility scores for control, and worms treated with derivatives with LPSF/PTS10, LPSF/PTS23, LPSF/PTS24 and praziquantel (PZQ) at different hours post-incubation.

Groups	Number of worms	Percent of worms (%) in motility scores after incubation ^a								
		24h			48h			72h		
		3.0	1.5	0	3.0	1.5	0	3.0	1.5	0
RPMI 1640	12	100			100			100		
DMSO 1.6%	12	100			100			100		
PZQ										
5 µM	12			100			-			-
20 µM	12			100			-			-
40 µM	12			100			-			-
100 µM	12			100			-			-
LPSF/PTS10										
5 µM	12	100			100			100		
20 µM	12	50	50			25	75		100	
40 µM	12	25	75			100		75	25	
100 µM	12			100			100		100	
LPSF/PTS23										
5 µM	12	100			100			100		50
20 µM	12			100			-		-	
40 µM	12			100			-		-	
100 µM	12			100			-		-	
LPSF/PTS24										
5 µM	12	100			100			100		
20 µM	12	100			100			100		
40 µM	12	100			50	50		50	50	
100 µM	12	50	50		50	50		25	75	

^a The measurement of mean worm motility is scored on a scale of 0 to 3 as follows: 3, movement of whole body; 1.5, movement of only one part of body or immobile but not dead; 0, dead.

Fig. 1 a–b SEM images of adult flukes *S. mansoni*. (a) Adult flukes of *S. mansoni* not exposed to LPSF/PTS23. Parasites incubated in maintenance medium for 120 h showing normal morphology. (b) GC, gynecophoral channel; OS, oral sucker; VS, ventral sucker. Medial and posterior portion. Figures c–g SEM images of adult flukes *S. mansoni* after exposure the LPSF/PTS23. (c) After 24 h, extensive erosion was observed over the entire body of the fluke; (d) After 48 h, multiple bubbles and projections (solid arrows) emerging from the interior of damaged tubercles; (e) After 72 h, tegument erosion can be visualized at higher magnification; (f) After 96 h, some tubercles lack their spines (dashed arrow). (g) Damaged tubercles and bubbles present inside the lesion, as observed after 120 h of drug exposition.



REFERENCES

1. Vimieiro AC, Araujo N, Katz N, Kusel JR, Coelho PM. Schistogram changes after administration of antischistosomal drugs in mice at the early phase of *Schistosoma mansoni* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013; 108: 881-6.
2. World Health Organization (WHO). Media centre – Schistosomiasis. Factsheet N°115 - Março 2013.
www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html. Acessado no dia 15/03/2013.
3. Nascimento GL, Oliveira MR. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2014; 108: 29-36.
4. World Health Organization (WHO). Media centre – Schistosomiasis. Factsheet N°115 - Janeiro 2012. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html. Acessado no dia 15/03/2013.
5. Melman SD, Steinauer ML, Cunningham C, Kubatko LS, Mwangi IN, Wynn NB, Mutuku MW, Karanja DM, Colley DG, Black CL. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. PloS Negl Trop Dis. 2009; 3: e504.
6. Pitta MGR, Pitta MGR, Rêgo MJBM, Galdino SL. The evolution of drugs on schistosoma treatment: looking to the past to improve the future. Mini Rev Med Chem. 2013; 13: 493-508.
7. Fabri RL, Aragão DM, Florêncio JR, Pinto Nde C, Mattos AC, Coelho PM, Castañon MC, Vasconcelos EG, Pinto Pde F, Scio E. Chromatographic fingerprint analysis and effects of the medicinal plant species *Mitracarpus frigidus* on adult *Schistosoma mansoni* worms. Biomed Res Int. 2014; 2014:9413-8.
8. Moraes J, Carvalho AA, Nakano E, Almeida AA, Marques TH, Andrade LN, Freitas RM, Sousa DP. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. Parasitol Res. 2013; 112: 603-10.
9. Neves JK, Lima MCA, Pereira VR, Melo CM, Peixoto CA, Pitta IR, Albuquerque MC, Galdino SL. Antischistosomal action of thioxo-imidazolidine compounds: An ultrastructural and cytotoxicity study. Exp Parasitol. 2011; 128: 82-90.
10. Dubois F, Caby S, Oger F, Cosseau C, Capron M, Grunau C, Dissous C, Pierce RJ. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol. 2009; 168: 7-15.

11. Silva MPN, Oliveira GLS, Carvalho RBF, Sousa DP, Freitas RM, Pinto PLS, Moraes J. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. *Molecules*. 2014; 19: 3793.
12. Caterina MC, Perillo IA, Boiani L, Pezaroglo H, Cerecetto H, González M. Imidazolidines as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem*. 2008; 16: 2226-34.
13. Carvalho GS, Dias RM, Pavan FR, Leite CQ, Silva VL, Diniz CG, Paula DT, Coimbra ES, Retailleau P, Silva AD. Synthesis, cytotoxicity, antibacterial and antileishmanial activities of imidazolidine and hexahydropyrimidine derivatives. *Med Chem*. 2013; 9: 351-9.
14. Dias LC, Dessoy MA, Silva JJN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD, Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da Arte e Perspectivas no Desenvolvimento de Novos Fármacos. *Química Nova*. 2009; 15: 2444-57.
15. Albuquerque MCA, Silva TG, Pitta MGR, Silva ACA, Silva PG, Malagueño, E, Santana JV, Wanderley AG, Lima MCA, Galdino SL, Barbe J, Pitta IR. Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioxoimidazolidine compounds. *Pharmazie*. 2005; 60: 13-7.
16. Brandão SSF, Andrade AMC, Pereira DTM, Barbosa-Filho JM, Lima MCA, Galdino SL, Pitta IR, Barbe J. A novel way of synthesis of 1,3,5-trisubstituted-2-thioxoimidazolidinones. *Heterocycl Comm*. 2004; 10: 9-14.
17. Pitta IR, Lima MCA, Albuquerque MCP, Galdino SL. Braz. Patent PI, PI-0305000-9, 2005; 25.
18. Sudo RT, Calasans-Maia JA, Galdino SL, Lima MCA, Zapata-Sudo, G, Hernandez MZ, Pitta IR. Interaction of Morphine With a New α 2-Adrenoceptor Agonist in Mice. *J Pain*. 2010; 11: 71-78.
19. Gouveia FL, Oliveira RMB, Oliveira TB, Silva IM, Nascimento SC, Sena KXFR, Albuquerque JFC. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some 5-arylidene-4-thioxo-thiazolidine-2-ones. *Eur J Med Chem*. 2009; 44: 2038-43.
20. Mourão RH, Silva TG, Soares ALM, Vieira ES, Santos JN, Lima MCA, Lima VLM, Galdino SL, Barbe J, Pitta IR. Eur. J. Med. Chem. 2005, 40, 1129. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. *Eur J Med Chem*. 2005; 40: 1129-33.
21. Handzlik J, Szymanska E, Wojcik R, Dela A, Jastrzebska-Wiesek M, Karolak-Wojciechowska J, Fruzinski A, Siwek A, Filipek B, Kiec-Kononowicz K. Synthesis

- and SAR-study for novel arylpiperazine derivatives of 5-arylidenehydantoin with α_1 -adrenoceptor antagonistic properties. *Bioorg Med Chem*. 2012; 20: 4245-7.
22. Guarda VLM, Pereira MA, De Simone CA, Albuquerque JC, Galdino SL, Chantegrel J, Perrissin M, Beney C, Thomasson F, Pitta IR, Luu-Duc C. Synthesis and structural study of arylidene thiazolidine and benzothiazine compounds. *Sulfur Letters*. 2003; 26: 17-27.
 23. Karolak-Wojciechowska J, Szymanska E, Mrozek A, Kiec-Kononowicz K. Crystallographic and spectroscopic studies of 5-arylidene-2-amino-imidazol-4-ones. *J Mol Struct*. 2009; 930: 126-34.
 24. Simone CA, Zukerman-Schpector J, Pereira MA, Luu-Duc C, Pitta IR, Galdino SL, Amorim ELC. 3-(4-Bromobenzyl)-5-(4-fluorobenzylidene)-imidazolidine-2,4-dione. *Acta Crystallog*. 1995; 2620-1.
 25. Tan F, Ang KP, Fong YF. (Z)- and (E)-5-arylmethylenehydantoin: spectroscopic properties and configuration assignment *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II*. 1986; 12: 1941-4.
 26. Rêgo MJB, Galdino-Pitta MR, Pereira DTM, Silva JC, Rabello MM, Lima MCA, Hernandez MZ, Pitta IR, Galdino SL, Pitta MGR. Synthesis, *in vitro* anticancer activity and *in silico* study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives. *Med Chem Res*. 2014; 23: 3220-6.
 27. Lima CM, Freitas FI, Moraes LC, Cavalcanti MG, Silva LF, Padilha RJ, Barbosa CG, Santos FA, Alves LC, Diniz MF. Ultrastructural study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after *in vitro* exposure to allicin. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2011, 44, 327.
 28. Horiuchi A, Satou T, Akao N, Koike K, Fujita K, Nikaido T. The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. *Vet Parasitol*. 2005; 129: 83-7.
 29. Matos-Rocha TJ, Cavalcanti MGS, Barbosa-Filho JM, Lúcio AS, Veras DL, Feitosa AP, Siqueira Júnior JP, Almeida RN, Marques MO, Alves LC, Brayner FA. *In vitro* evaluation of schistosomicidal activity of essential oil of *Mentha x villosa* and some of its chemical constituents in adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Planta Med*. 2013; 79: 1307-12.
 30. Neves JKAL, Sarinho S, Melo CML, Pereira VRA, Lima MCA, Pitta IR, Albuquerque MCP, Galdino SL. Immunological studies and *in vitro* schistosomicide action of

- new imidazolidine derivatives. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2011; 17: 277-86.
31. Neves JK, Botelho SP, Melo CM, Pereira VR, Lima MCA, Pitta IR, Albuquerque MCP, Galdino SL. Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*. 2010; 107: 531-8.
 32. Silva AL, Oliveira SA, Oliveira JF, Santiago EF, Almeida Júnior ASA, Jacobi ITT, Peixoto CA, Rocha VPC, Soares MBP, Pitta IR, Lima MCA. Tegumental Changes in Adult *Schistosoma mansoni* Induced by a New Imidazolidinic Derivative. *Brit J Pharm Res*. 2014; 4: 1988-2005.
 33. Camacho M, Tarrab-Hazdai R, Espinoza B, Arnon R, Agnew A. The amount of acetylcholinesterase on the parasite surface reflects the differential sensitivity of *Schistosoma* species to metrifonate. *Parasitology*. 1994; 108:153-60.
 34. Cioli D, Pica-Mattoccia L, Archer S. Antischistosomal drugs: past, present ... and future?. *Pharmacology and Therapeutics*. 1995; 68: 35-85.
 35. Pica-Mattoccia L, Cioli D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. *Int J Parasitol*. 2004; 34: 527-33.
 36. Werbel LM, Elslager EF, Islip PJ, Closier MD. Antischistosomal effects of 5-(2,4,5-trichlorophenyl)hydantoin and related compounds. *J Med Chem*. 1977; 20:1569.
 37. Pitta IR, Lima MCA, Albuquerque MCP, Galdino SL. Braz. Patent PI, PI-0305000-9, 2005; 25.
 38. Santiago EF, Oliveira SA, Oliveira GB, Moreira DR, Gomes PA, Silva AL, Barros AF, Silva AC, Santos TA, Pereira VR, Gonçalves GG, Brayner FA, Alves LC, Wanderley AG, Leite AC. Evaluation of the Anti-*Schistosoma mansoni* Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014, 58, 352-63.
 39. Taman A, Ribeiro P. Glutamate-mediated signaling in *Schistosoma mansoni*: A novel glutamate receptor is expressed in neurons and the female reproductive tract. *Mol Biochem Parasitol*. 2011; 176:42-50.
 40. Aires AL, Ximenes ECPA, Silva RAR, Barbosa VX, Góes AJX, Peixoto CA, Souza VMO, Albuquerque MCPA. Ultrastructural analysis of b-lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Exp Parasitol*. 2014; 142: 83-90.

41. Oliveira SM, Albuquerque MCP, Pitta MGR, Malagueño E, Santana JV, Lima MCA, Pitta IR, Galdino SL. A Resposta do *Schistosoma mansoni* Mantido *In Vitro* frente a Derivados Imidazolidinônicos. Acta Farm Bonaerense. 2004; 3: 343-8.
42. Tallima H, Ridi R. Praziquantel binds *Schistosoma mansoni* adult worm actin. Int J Antimicrob Agents. 2007; 29: 570-5.
43. Thibaut JPB, Monteiro LM, Leite LCC, Menezes CMS, Lima LM, Noel F. The effects of 3-methylclonazepam on *Schistosoma mansoni* musculature are not mediated by benzodiazepine receptors. Eur J Pharmacol. 2009; 606: 9-16.
44. Noel, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade do verme adulto. In: Carvalho OS, Coelho PMZ, Lenzi HL. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: Uma interdisciplinary vision. Rio de Janeiro: Fiocruz. 2008; 207-44.
45. Paula FR, Serrano SHP, Tavares LC Aspects of bioactivity and toxicity of nitrocompounds. New Quim. 2009; 32: 1013-20.
46. Thomas G. Medicinal chemistry: an introduction. Editora Guanabara Koogan; 2003.

ARTIGO 2

***IN VITRO* ANTI-*Schistosoma mansoni* AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF NOVEL IMIDAZOLIDINIC COMPOUNDS**

Matos-Rocha, T.J., Lima, MCA., Almeida Júnior, ASA., Santos, RLM., Brayner, FA., Alves, LC., Pitta-Galdino, MR., Rêgo, MJB.M., Pitta, IR. and Pitta, MGR.

BRAZILIAN JOURNAL OF BIOLOGY



***In vitro* anti-*Schistosoma mansoni* and cytotoxic activities of novel imidazolidinic compounds**

Matos-Rocha, T.J. ^{a,b,d*}, Lima, MCA. ^c, Almeida Júnior, ASA. ^c, Santos, RLM. ^c, Brayner, FA. ^{a,d}, Alves, LC. ^{a,d}, Pitta-Galdino, MR. ^{b,c}, Rêgo, MJB. ^{b,c}, Pitta, IR. ^{b,c} and Pitta, MGR. ^b

^a Laboratório de Biologia Celular e Molecular, Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Professor Moraes Rego, s/n - Campus da UFPE - Cidade Universitária | Recife/PE - Brasil | CEP: 50.740-465, Recife, PE, Brasil.

^b Laboratório Imunomodulação e Novas Abordagens Terapêuticas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.

^c Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.

^d Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE - CEP: 50670-901, Recife, PE, Brasil.

*email: thy_rocha@hotmail.com
(With 1 table – page 10)

Abstract

Imidazolidines are a broad class of bioactive pentagonal heterocyclic compounds with diverse biological effects including anti-*Trypanosoma cruzi*, schistosomicidal and leishmanicidal activities. Herein we report a series of novel imidazolidinic compounds, which were synthesized, characterized and tested as antischistosomal agents *in vitro*. Efficacy and safety of these compounds were analyzed through cytotoxicity in Peripheral blood mononuclear cell (PBMC). During the assays parameters such as motility of adult worms, separated worms, motility, oviposition and especially the mortality rate of adult worms were evaluated. LPSF/PTS2 and LPSF/PTS4 did not show toxicity up to 100 μ M, however, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 and LPSF/PTS19 were toxic at concentrations above 10 μ M. Among all tested compounds, compounds LPSF/PTS2 and LPSF/PTS4 at different tested concentrations (10, 40, 80 and 100 μ M) showed the highest schistosomicidal activity, with a significant decline in motility, inhibition of pairing and oviposition and mortality. LPSF/PTS4 was able to cause worm death percentage values of 50% after 96 h (at 100 μ M), besides LPSF/PTS2 promoted 25 % of death of the parasites at 100 μ M after 120 h. LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 and LPSF/PTS19 (10 μ M) were also able to reduce motility and reduced oviposition of adult worms *in vitro*. LPSF/PTS4 showed antischistosomal activity and exhibited no cytotoxicity to mammalian cells. These results suggest that the LPSF/PTS4 is very promising for the development of new schistosomicidal agents.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, imidazolidines, activity anti-*Schistosoma mansoni*.

Atividades citotóxica e anti-*Schistosoma mansoni* *in vitro* de novos compostos imidazolidínicos

Resumo

As Imidazolidinas é uma classe ampla de compostos heterocíclicos pentagonais bioativos com diversos efeitos biológicos incluindo atividades antifúngica, antimicrobiana, anti-*Trypanosoma cruzi*, esquistossomicida e leishmanicida. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade esquistossomicida de novos compostos imidazolidínicos (LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 e LPSF/PTS19) foram testados contra *Schistosoma mansoni*, cuja potencial esquistossomicida ainda não foi descrito. Os resultados mostram que novos compostos imidazolidínicos levaram a mortalidade de vermes, com um declínio significativo na motilidade, à inibição de emparelhamento, oviposição e mortalidade. LPSF/PTS4 foi capaz de fazer com que os valores percentuais morte verme de 50% após 96 h (100 μ m); além dos LPSF/PTS2 promoveu 25% de morte dos parasitos em 100 μ M após 120 h. Os resultados sugerem que LPSF/PTS4 deve ser considerado para mais estudos para elucidar os mecanismos induzidos por trás dessa resposta. Assim, é possível que LPSF/PTS4 pode ser futuro candidato a fármaco esquistossomicida.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*, Imidazolidinas, Atividade anti-*Schistosoma mansoni*.

Short running title: *In vitro* schistosomicidal activity of imidazolidinic compounds.

1. Introduction

Schistosomiasis is the second most significant parasitic disease in the world after malaria, in socioeconomic terms (Steinmann et al., 2006), is a chronic liver and intestinal parasitic disease caused the genus *Schistosoma*, mainly *Schistosoma mansoni*, with 207 million people infected (Vimieiro et al., 2013) and further 779 million at risk (Nascimento and Oliveira, 2014). At present, praziquantel (PZQ) is the drug of schistosomiasis control choice for the schistosomiasis. However, dependence on a single drug may hasten the selection of drug-resistant parasites, as pointed out by Doenhoff et al., 2008. Accordingly, it is important the search for antiparasitic drugs, mainly from imidazolidinic compounds, has been intensified in the last years (Silva et al., 2012).

The imidazolidines are a broad class of bioactive pentagonal heterocyclic compounds with diverse biological activity (Dias et al., 2009). The imidazolidine system has antifungal and antimicrobial properties, leishmanicidal (Carvalho et al., 2013) and anti-*Trypanosoma cruzi* effects (Caterina et al., 2008).

The schistosomicidal activity of imidazolidine derivatives have been demonstrated by *in vitro* and *in vivo* studies with adult *S. mansoni* worms (Neves et al., 2010). Neves et al. (2011) demonstrated the *in vitro* schistosomicidal activity of new imidazolidine derivatives with worms ultrastructural changes induced induction and less cytotoxic effect on splenocytes than PZQ. Silva et al. (2012), demonstrated the *in vivo* schistosomicidal activity.

Niridazole, 1-(5-nitro-thiazol-2-yl)-imidazolidin-2-one, has been used over the past century for its schistosomicidal properties. The drug received considerable attention, probably because it was one of the early treatment options to be administered orally (Dubois et al., 2009).

In order to provide new structures, for use in future strategies to control schistosomiasis, the search for schistosomicidal compounds has intensified in recent years (Moraes et al., 2013; Matos-Rocha et al., 2013). Therefore, we describe the synthesis and schistosomicidal activity of imidazolidine derivatives on worms adults of *S. mansoni in vitro*.

2. Materials and methods

2.1. Compound

The compounds (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-(piperidin-1-yl)benzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one (LPSF/PTS2), (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-phenoxybenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one (LPSF/PTS4), (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(3,4-diphenoxybenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one encoded LPSF/PTS5, 5-(pyridin-3-yl-(benzylidene)-3-(2-chloro-6-fluorine-benzyl)-4-thioxoimidazolidin-2-one encoded (LPSF/PTS6), (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-nitrobenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one (LPSF/PTS18), (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(3-nitrobenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one (LPSF/PTS19) were obtained from Laboratório de Planejamento de Síntese de Fármacos at Universidade Federal de Pernambuco (Brazil) and was duly identified by nuclear magnetic resonance of hydrogen as well as infrared (IR) and mass spectroscopy (MS).

The scheme 1 displays the synthetic route of the six derivatives.

The PZQ, all other analytical grade or cell culture reagents were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2. Ethical approval

Ethics approval was obtained from ethical committee from Health Science Center of Federal University of Pernambuco and Hematology and Hemotherapy Foundation of Pernambuco (protocols 483/10 and 57/10 respectively). All experiments were authorized by the Committee for Ethics in Animal Care of Foundation Oswaldo Cruz, in accordance with nationally and internationally accepted principles for laboratory animal use and care (CEUA/FIOCRUZ), approval number: 06/2010.

2.3. Cultures and Cell viability tests

Peripheral blood mononuclear cells were obtained from heparinized blood from healthy, nonsmoking donors who had not taken any drugs for at least 15 days prior to sample collection (10 volunteers), and the cells were isolated via a standard method of density-gradient centrifugation over Ficoll Hypaque solution (GE Healthcare). Cells were counted in a Neubauer chamber, and viability was determined by the trypan blue exclusion method. Cells were used only when the viability was 98 %. All donors gave informed consent, and the study was approved by the Human Research Ethics Committee of UFPE in the Health Sciences Center (CEP/CCS/UFPE N0 483/10 and 57/10). Cells were plated in 96-well plates (10^6 cells/well). After 24 h, the test compound was added (1, 10 and 100 μ M), and the cells were incubated for 48 h and then subjected to the MTT assay as described.

PBMCs from health donors were incubated in the presence of three different concentrations (1, 10 and 100 μ M for PBMCs) of the compounds for 48 hours. Then cytotoxicity was quantified by the ability of living cells to reduce MTT (yellow) to a purple compound. The compounds were tested in three independent assays, and at the end of incubation wells were centrifuged, and the medium was replaced by medium without compound (150 μ L) containing MTT (0.5 mg/mL). Three hours later the MTT formazan was

diluted with 100 μ L of 20% SDS, and its absorbance was measured (570 nm) by the apparatus (BioTek EL808). The cytotoxic activity was quantitated as the percentage of vehicle treated control absorbance. In this sense, the absorbance of the LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 and LPSF/PTS19 treated group was obtained in relation to vehicle treated control group. In all analyzed experiments, the vehicle (DMSO 0.1%) treated group presented viability >98% compared to cells control without vehicle (Pereira et al., 2014; Silva et al., 2014).

2.4. *In Vitro Studies with S. mansoni*

The LE (Luiz Evangelista) strain of *S. mansoni* was maintained by passage through *Biomphalaria glabrata* snails and Swiss mice. After 8 weeks, *S. mansoni* adult worms (males and females) were recovered under aseptic conditions from mice previously infected with 120 cercariae, by perfusion of the liver and mesenteric vein (Magalhães et al., 2012). Worms were washed in RPMI 1640 medium (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, USA), kept at pH 7.5 with 20mM HEPES supplemented with penicillin (100 UI.ml⁻¹), streptomycin (100mg.ml⁻¹) and 10% bovine fetal serum (Gibco, Life Technologies, Gaithersburg, Maryland, USA).

For the *in vitro* test with *S. mansoni*, samples were dissolved in DMSO and used at concentrations ranging from 10 to 100 μ M (compounds). Solutions of samples were added to the RPMI 1640 medium containing one adult worm pair after a period of 24 h of adaptation to the culture medium. The parasites were kept for 120 h and monitored every 24 h in order to evaluate their general condition (motor activity and mortality rate), egg production, and egg development (Fernandes et al., 2013). The worms were considered dead when no movement was observed for at least 3 minutes of examination. Changes in the pairing were also evaluated using an inverted microscope (Leitz). All experiments were carried out in

quadruplicate and repeated at least four times, using 10 μM PZQ as positive control group and RPMI 1640 medium and RPMI 1640 with 1.6% DMSO as negative control groups (Matos-Rocha et al., 2013).

Motility and survival of worms were assessed according to the criteria scored in a viability scale of 0–3. The scoring system was as follows: 3, complete body movement; 1.5, partial body movement or immobile but alive; and 0, dead (Horiuchi et al., 2005).

3. Results

In this study, the *in vitro* schistosomicidal activity of LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 and LPSF/PTS19. *S. mansoni* parasite mortality was evaluated by incubation of the parasite with different concentrations and by evaluation of decrease in motor activity of these worms (Table 1).

The evaluation of cytotoxic compounds showed that LPSF/PTS2 and LPSF/PTS4, presented nontoxic effects at concentrations up to 100 μM . However, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 and LPSF/PTS19 presented toxic effects at concentrations up to 10 μM . The occurrence of lethal effect on the fourth treatment day was noted for LPSF/PTS4 at a concentration of 100 μM ; however, on the fifth treatment day, LPSF/PTS4 prompted 25 % mortality at concentrations of 80 μM . LPSF/PTS-2 caused 25% parasite mortality at concentrations of 100 μM .

LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 and LPSF/PTS19 were also evaluated against adult *S. mansoni*. All pairs of worms separated when exposed to 10 μM of LPSF/PTS18 and LPSF/PTS19. LPSF/PTS6 while at 10 μM , 75% of the pairs remained coupled. The compound LPSF/PTS5 at 10 μM concentration did not showed any schistosomicidal effect until 120 h post-incubation.

In contrast, parasites belonging to the positive control group PZQ caused 100% parasite death on the first day of incubation. On the other hand, worms remained viable in the negative control group and also vehicle treated until the end of the incubation period (120 h).

The activity of LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 and LPSF/PTS19 on the motor activity of the worms was examined, during all observation intervals (24 and 120 h). Reduction of the activity was observed. The compounds were effective in reducing the motor activity was seen in 100 % of the adult parasites after 24 h of exposure to 100, 80 and 40 μ M with LPSF/PTS2 and LPSF/PTS4. Moreover, male and female adults showed a decrease in motor activity after incubation with LPSF/PTS18 and LPSF/PTS19 (in concentration from 10 μ M). PZQ (10 μ M) caused 100% mortality after 24 h of incubation. However, the negative control group adult *S. mansoni* worms did not showed decrease in motor activity of adult parasites until 120 h post-incubation.

Chemical part:

Compound: (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-(piperidin-1-yl)benzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one

Compound: (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-phenoxybenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one

Compound: (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(3,4-diphenoxybenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one

Compound: (Z)-5-(pyridin-3-yl(benzylidene))-3-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-thioxoimidazolidin-2-one

Compound: (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(4-nitrobenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one

Compound: (Z)-1-(2-chloro-6-fluorobenzyl)-4-(3-nitrobenzylidene)-5-thioxoimidazolidin-2-one

Table 1 - *In vitro* effects of LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 and LPSF/PTS19 against *Schistosoma mansoni* adult worms.

Group [μM]	Incubation period [h]	Separated worms [%]	Inhibition of oviposition [%]	Dead worms [%]	Decrease of motor activity ^c [%]			Cytotoxicity ^d (μM)
					3,0	1,5	0	
Control ^a	120h	0	0	0	100			-
DMSO	120 h	0	0	0	100			-
PZQ ^b	24 h	100	100	100			100	> 100
LPSF/PTS2								
100	24	100	100	0	100			
	120	100	100	100			100	
80	24	100	100	0	100			
	120	100	100	100			100	
40	24	0	100	0	100			> 100
	120	50	100	0		100		
10	24	0	100	0	100			
	120	50	100	0	50	50		
LPSF/PTS4								
100	24	100	100	0	100			
	120	100	100	100			100	
80	24	100	100	0	100			
	120	100	100	100			100	
40	24	0	100	0	100			> 100
	120	100	100	0		100		
10	24	0	100	0	100			
	120	50	100	0		100		
LPSF/PTS5								
10	24	0	100	0	100			> 10
	120	50	100	0		100		
LPSF/PTS6								
10	24	0	100	0	100			> 10
	120	50	100	0		100		
LPSF/PTS18								
10	24	0	100	0	100			> 10
	120	50	100	0		100		
LPSF/PTS19								
10	24	0	100	0	100			> 10
	120	50	100	0		100		

^aControl group: paired adult worms without apparent morphological change, presence of eggs and sucker adherence.

^bPraziquantel (1.0 μg/ml) was used as a positive control.

^c The measurement of mean worm motility is scored on a scale of 0 to 3 as follows: 3, movement of whole body; 1.5, movement of only one part of body or immobile but not dead; 0, dead.

^dCalculated at three concentrations using data obtained from at least three independent experiments, with a SD less than 10% in all cases. The highest nontoxic concentration on PBMCs.

4. Discussion

The Special Program for Research and Training in Tropical Disease to incentivize the discovery and development of novel antischistosomal compounds, therefore, the development of new drugs from synthetic products for schistosomiasis, is required to complement classical chemotherapy (Boghdadi *et al.*, 2013). Imidazolidine derivatives have been studied by several research groups. So far, the main activities assigned to imidazolidines are antibacterial, antiamebic, anti-*T. cruzi*, leishmanicidal and schistosomicidal (Kalyaham *et al.* 1992; Carvalho *et al.*, 2013; Sharma and Khan 2001; Pitta *et al.* 2006; Caterina *et al.* 2008; Silva *et al.*, 2012).

Considerable efforts are ongoing in the development of novel schistosomicidal agents. As part of our continuing interest in imidazolidine derivatives with a view to finding out schistosomicidal drugs and new agents with activity against *Schistosoma* species (Neves *et al.*, 2010; Neves *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012).

It is known that the structural variations lead to alterations in the physical properties and reactivity of the chemical compounds, thereby giving rise to changes in the distribution in the cells and tissues and in access to the active enzyme and receptor centers. The molecular modification of imidazolidine by bioisosteric replacement produces a biological response. (Pitta *et al.*, 2006).

In recent years a number of studies have been developed through *in vitro* screening using compounds natural and synthetic, but the assessment of therapeutic activity using *in vivo* models should be performed (Moraes, 2012).

This study evaluated the schistosomacide effect of imidazolidine derivatives (LPSF/PTS4, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 and LPSF/PTS19) with different substituent groups by determining their *in vitro* viability against adult *S. mansoni* worms.

Importantly, *in vivo* studies with imidazolidine derivatives have been previously demonstrated in animal models. For example, Oliveira *et al.* (2004) showed significant *in vivo* schistosomicidal activity of (Z)-3-(4-cloro-benzyl)-5-(4-nitro-benzylidene)-imidazolidine-2,4-dione showed a significant reduction of 70% of inviable, when the compound was administered.

Data of the current study have demonstrated that LPSF/PTS2 and LPSF/PTS4 were not cytotoxic and induced higher mortality of adult worms. But in terms of absence of oviposition by adult worms and motor abnormalities, the imidazolidines were similar to PZQ. In fact, PZQ at low concentrations, *in vitro*, appears to impair the function of the worms' suckers and at higher concentrations increases contraction and tegumental lesions (vacuolization and vesicle formation) that are indistinguishable from the phenomena observed *in vivo* (Xiao *et al.* 1985; Martin 1997; Cioli and Pica-Mattoccia 2003; Badreldin 2006).

These same physiological alterations seen here were observed in adult worms treated with imidazolidines in other studies realized by our group (Albuquerque *et al.*, 2005; Neves *et al.*, 2010; Neves *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2014). Many drugs have been compared with praziquantel and their cytotoxicity and ability to kill adult worms of *S. mansoni* have been shown to be equivalent to the reference drug (Dayan 2003; Sayed *et al.* 2008).

All compounds evaluated in this study were able to decrease the motility of the worms. It is important to emphasize that, in relation to the impact in motor activity, studies have shown that the musculature of *S. mansoni* can serve as a therapeutic target, because the motility of worms is associated with important neurotransmitters or neuromodulators (Oliveira *et al.*, 2012).

Thus, a reduction in the motility of adult *S. mansoni* exposed to imidazolidine derivatives treatment might be associated with alterations in the neurotransmitter or neuromodulator system of the parasite (Oliveira *et al.*, 2012).

In comparison to the literature findings, it was observed that some imidazolidine derivatives have been reported as promising schistosomicidal drugs (Silva *et al.*, 2012). The *in vitro* activity of different concentrations of the LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 and LPSF/PTS19 on *S. mansoni* adult worms were assessed. In this study, no eggs were produced by female adult worms after the imidazolidine derivatives treatment, which suggested that the compounds significantly impaired parasite fecundity.

Regarding the reproductive capacity of female *S. mansoni*, a 100% reduction in egg laying at concentrations of 10 - 100 μ M after 120 h of incubation was observed in comparison with the negative control group. According to Barth *et al.* (1996), changes in the reproductive capacity of *S. mansoni* are associated with changes in the reproductive system of males and females when exposed to drugs with schistosomicidal properties. For example, similar results were achieved by Neves *et al.* (2011) using 1-(4-chlorobenzyl)-4-[(4-fluorophenyl)hydrazono]-5-thioxoimidazolidin-2-one (LPSF/PT11) and Neves *et al.* (2010) using 5-(4-fluorobenzylidene-3-(4-nitrobenzyl)-4-thioxoimidazolidin-2-one (LPSF/RSZ05).

In general, it was also observed compounds that possessed an imidazolidine ring system showed significant schistosomicidal activity on adult *S. mansoni* worms (Pitta *et al.*, 2006; Neves *et al.*, 2010).

In comparison to the literature findings, was also observed that the imidazolidine ring, which is present in an important class of heterocyclic compounds present in many biologically potent active molecules, demonstrated schistosomicidal activity, is also present in the most active compounds of the whole series. Some imidazolidine have, in fact, been shown in the literature as anti-*S. mansoni* drugs (Neves *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2014).

Chemical groups that are essential for the manifestation and intensity of many biological reactions may be considered biofunctional groups (Korolkovas, 1974). Here, we

observed the structural similarity of imidazolidines synthesized with niridazole (Ambilhar®), chemically named 1-(5-nitro-tiofeno-3-il)-imidazolidin-2-ona. Imidazolidines show the same pharmacophoric group of niridazole and present HC=C-N and C-N=N-C-N substitutions at position 5 of the imidazolidine ring. Chand *et al.* (2005) observed that C-N=N-C-N can act like kelant agents because the nitrogen of imidazolidine and the nitrogen of the arilaze groups act like donor centers (Neves *et al.*, 2010).

The biofunctional groups of imidazolidines contain alkyl radicals, chlorine atoms (LPSF/PTS2) and fluoride (LPSF/PTS4). These radicals can change the alkalinity and or lipophilicity of drugs, inducing changes in intractions with the receptor sites and in absorption phenomena and transport through different cellular compartments. We believe that this characteristic may be responsible for the better biological response of imidazolidine derivatives.

In conclusion, the results obtained with derivatives LPSF/PTS2 and LPSF/PTS4 suggest that the biofunctionality of these compounds is due to the presence of the nitro group, which acts as a parasitophorous group. The results of this study suggest that LPSF/PTS2 and LPSF/PTS4 possess *in vitro* schistosomicidal action against *S. mansoni* adult worms.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Pernambuco (FACEPE) and Schistosomiasis Laboratory of the Departament of Parasitology, Oswaldo Cruz Institute and Laboratory of Imunopatology Keizo Asami (LIKA/UFPE) for support for the experiments.

References

- ALLAM, G. and ABUELSAAD, AS., 2014. *In vitro* and *in vivo* effects of hesperidin treatment on adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Journal of Helminthology*, vol. 88, no. 3, p. 362-370. <http://dx.doi.org/10.1017/S0022149X13000278>.
- ALBUQUERQUE, MCPA., SILVA, TG., PITTA, MGR., SILVA, ACA., SILVA, PG., MALAGUEÑO, E., SANTANA, JV., WANDERLEY, AG., LIMA, MCA., GALDINO, SL., BARBE, J. and PITTA, IR., 2005. Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioxo-imidazolidine compounds. *Pharmazie*, vol. 60, no. 1, p. 13-17.
- BARTH, L. R.; FERNANDES, A. P.; RODRIGUES, V., 1996. Oviposition by *Schistosoma mansoni* during *in vitro* cultivation. *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, vol. 38, p. 423-426.
- BOGHDADI, G., KHALIK, DA., WAHAB, AS. and FARGHALY, A., 2013. Immunomodulatory effect of R848 on cytokine production associated with *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitology Research*, vol. 112, no. 1, p. 135-140. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-3116-2>.
- CARVALHO, GS., DIAS, RM., PAVAN, FR., LEITE, CQ., SILVA, VL., DINIZ, CG., PAULA, DT., COIMBRA, ES., RETAILLEAU, P. and SILVA, AD., 2013. Synthesis, Cytotoxicity, Antibacterial and Antileishmanial Activities of Imidazolidine and Hexahydropyrimidine Derivatives. *Medicinal Chemistry*, vol. 9, no. 3, p. 351-359.
- CATERINA, MC., PERILLO, IA., BOIANI, L., PEZAROGLO, H., CERECETTO, H. and GONZÁLEZ, M., 2008. Imidazolidines as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 5, p. 2226-2234.
- CHAND, B. G.; RAY, U. S.; MOSTAFA, G.; CHENG, J.; LU, T. H.; SINHA, C., 2005. Difference in bonding behaviour of azide and thiocyanate to Hg (II)-azoimidazoles. *Inorganica Chimica Acta*, vol. 358, p. 1927-1933.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L., 2003. Praziquantel. *Parasitology Research*, vol. 90, p. 3-9.
- DAYAN, A. D., 2003. Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics. *Acta Tropica*, vol. 86, p. 141-159.
- DIAS, LC., DESSOY, MA., SILVA, JJN., THIEMANN, OH., OLIVA, G. and ANDRICOPULO, AD., 2009. Quimioterapia da doença de chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*, vol. 32, no. 9, p. 2444-2457.
- DOENHOFF, MJ., CIOLI, D., UTZINGER, J., 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, vol. 21, no. 6, p. 659-667. <http://dx.doi.org/10.1097/QCO.0b013e328318978f>.

DUBOIS, FS., CABY, OF., COSSEAU, C., CAPRON, M., GRUNAU, C., DISSOUS, C., PIERCE, RJ., 2009. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 168, no. 1, p. 7-15. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.06.001>.

FERNANDES, FS., REZENDE JÚNIOR, CO., FERNANDES, TS., SILVEIRA LS., REZENDE, CAM., ALMEIDA, M. V., PAULA, R. G., RODRIGUES, SILVA FILHO, A. A. and COURI, MRC., 2013. Anthelmintic Effects of Alkylated Diamines and Amino Alcohols against *Schistosoma mansoni*. *BioMed Research International*, vol. 2013, p. 1-9. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/783490>.

GOUVEIA, FL., OLIVEIRA, RMB., OLIVEIRA, TB., SILVA, IM., NASCIMENTO, SC., SENA, KXFR., ALBUQUERQUE, JFC., 2009. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some 5-arylidene-4-thioxo-thiazolidine-2-ones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 44, no. 5, p. 2038-2043. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2008.10.006>.

HANDZLIK, J., SZYMANSKA, E., WOJCIK, R., DELA, A., JASTRZEBSKA-WIESEK, M., KAROLAK-WOJCIECHOWSKA, J., FRUZINSKI, A., SIWEK, A., FILIPEK, B. and KIEC-KONONOWICZ, K., 2012. Synthesis and SAR-study for novel arylpiperazine derivatives of 5-arylidenehydantoin with $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonistic properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 20, no. 14, p. 4245-4247.

HORIUCHI, A., SATOU, T., AKAO, N., KOIKE, K., FUJITA, K. and NIKAIDO, T., 2005. The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. *Veterinary Parasitology*, vol. 129, no. 1-2, p. 83-87.

KALYAHAM, N.; SPARTHASARATHY, P. C.; ANANTHAN, L.; MANJUNATHA, S. G.; LIKHATE, M. A., 1992. Studies on antiamoebic compounds. Iv: synthesis of hexahydropyrimidines and tetrahydroimidazoles. *Indian Journal of Chemistry*, vol. 31, p. 243-247.

KAROLAK-WOJCIECHOWSKA, J., SZYMANSKA, E., MROZEK, A., KIEC-KONONOWICZ, K., 2009. Crystallographic and spectroscopic studies of 5-arylidene-2-amino-imidazol-4-ones. *Journal of Molecular Structure*, vol. 930, p. 126-34.

KOROLKOVAS, A., 1974. Fundamentos de farmacologia molecular: base para o planejamento de fármacos. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo.

MAGALHÃES, LG., SOUZA, JM., WAKABAYASHI, KAL., LAURENTIZ, RS., VINHO' LIS, AH., REZENDE, KCS., SIMARO, GV., BASTOS, JK., RODRIGUES, V., ESPERANDIM, V.R., FERREIRA, D.S., CROTTI, AEM., CUNHA, WR. and SILVA, MLA., 2012. *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, vol. 110, no. 5, p. 1747-1754. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-011-2695-7>

MARTIN, R. J., 1997. Mode of action of anthelminthic drugs. *The Veterinary Journal*, vol.154, p. 11-34.

MATOS-ROCHA, TJ., CAVALCANTI, MGS., BARBOSA-FILHO, JM., LÚCIO ASSC., VERAS, DL., FEITOSA, AP., SIQUEIRA JÚNIOR, JP., ALMEIDA RN., MARQUES MO.,

ALVES LC. and BRAYNER, FA., 2013. *In vitro* evaluation of schistosomicidal activity of essential oil of *Mentha x villosa* and some of its chemical constituents in adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Planta Medica*, vol. 79, no. 14, p. 1307-1312. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0033-1350732>.

MOURÃO, RH., SILVA, TG., SOARES, ALM., VIEIRA, ES., SANTOS, JN., LIMA, MCA., LIMA, VLM., GALDINO, SL., BARBE, J. and PITTA IR., 2005. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzyldiene thiazolidinediones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 40, no. 11, p. 1129-1133.

MORAES, J., CARVALHO, AA., NAKANO, E., ALMEIDA, AA., MARQUES, TH., ANDRADE, LN., FREITAS, RM. and SOUSA DP., 2013. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, vol. 112, no. 2, p. 603-610. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-012-3172-7>.

MORAES, J., 2012. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: Rodriguez-Morales, A.J. (Ed.), *Current Topics in Tropical Medicine*, vol. 1, p. 333-358.

NASCIMENTO, GL. and OLIVEIRA, MR., 2014. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 108, no. 1, p. 29-36. <http://dx.doi.org/10.1093/trstmh/trt109>.

NEVES, JK., LIMA, MCA., PEREIRA, VR., MELO, CM., PEIXOTO, CA., PITTA, IR., ALBUQUERQUE, MC. and GALDINO, SL., 2011. Antischistosomal action of thioxo imidazolidine compounds: an Ultrastructural and cytotoxicity study. *Experimental Parasitology*, vol. 128, no. 1, p. 82-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2011.01.021>.

NEVES, JK., BOTELHO, SP., MELO, CM., PEREIRA, VR., LIMA MCA., PITTA IR., ALBUQUERQUE, MCP. and GALDINO SL., 2010. Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*, vol. 107, no. 3, p. 531-538. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1886-y>

OLIVEIRA, RN., REHDER, VL., SANTOS OLIVEIRA, AS., JÚNIOR, ÍM., CARVALHO, JE., DE RUIZ, AL., JERALDO, VL., LINHARES, AX. and ALLEGRETTI, SM., 2012. *Schistosoma mansoni*: *in vitro* schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. *Experimental Parasitology*, vol. 132, no. 2, p. 135-143. <http://dx.doi.org/10.1016/j.exppara.2012.06.005>.

PEREIRA MC., CARDOSO PRG., ROCHA JÚNIOR, LF., RÊGO, MJM., GONÇALVES, S MC., SANTOS, FA., GALDINO-PITTA, MR., DANTAS, AT., DUARTE, ALBP. and PITTA, MGR., 2014. Simvastatin inhibits cytokines in a dose response in patients with rheumatoid arthritis. *Inflammation Research*, vol. 63, no. 4, p. 309-315. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-013-0702-4>.

PICA-MATTOCCIA, L. and CIOLI, D., 2004. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. *International Journal for Parasitology*, vol. 34, no. 4, p. 527-533.

PITTA, M. G. R.; SILVA, A. C. A.; NEVES, J. K. A. L.; SILVA, P. G.; IRMÃO, J. I.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R. and ALBUQUERQUE, M. C. P. A., 2006. New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 101, p. 313–316.

SAYED, A. A.; SIMEONOV, A.; THOMAS, C. J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C. P.; WILLIAMS, D. L., 2008. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. *Nature Medicine*, vol. 14, p. 407–412

SILVA, AC., NEVES, JK., IRMÃO, JL., COSTA, VM., SOUZA, VM., MEDEIROS, PL., SILVA, EC., LIMA, MCA., PITTA, IR, ALBUQUERQUE, MC. and GALDINO, SL., 2012. Study of the activity of 3-benzyl-5-(4-chloro-arylazo)-4-thioxo-imidazolidin-2-one against *Schistosomiasis mansoni* in mice. *Scientific World Journal*, vol. 2012, p. 520-524. <http://dx.doi.org/10.1100/2012/520524>.

SILVA, RR., PEREIRA, MC., MELO, MJ., HATZLHOFFER BLD., SILVA, AA., BEZERRA MAC., PITTA, IR. and PITTA, MGR., 2014. Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine*, vol. 65, no. 2, p. 143-147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2013.11.012>.

STEINMANN, P., KEISER, J., BOS, R., TANNER, M., and UTZINGER, J., 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 6, no. 7, p. 411-425.

VIMIEIRO, AC., ARAÚJO N., KATZ, N., KUSEL, JR. and COELHO, PM., 2013. Schistogram changes after administration of antischistosomal drugs in mice at the early phase of *Schistosoma mansoni* infection. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 108, no. 7, p. 881-886. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130135>.

XIAO, S. H.; CATTO, B. A.; WEBSTER, L. T.; 1985. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* *in vitro* and *in vivo*. *The Journal of Infectious Diseases*, vol. 151, p. 1130–1137.

6. DISCUSSÃO

Na busca por novas moléculas com atividade biológica sobre *S. mansoni* a realização de testes biológicos *in vitro* torna-se relevante, pois esse passo é vital para encontrar uma substância líder ou guia que possa ser posteriormente usada em ensaios *in vivo*, reduzindo os custos desse processo. Por essa razão, quando são testadas empiricamente substâncias em que não há um prévio conhecimento sobre a ação em determinados alvos, o teste *in vitro* fornece um parâmetro inicial para que se possa, posteriormente, partir para uma abordagem seletiva, permitindo uma investigação biológica de compostos quimicamente derivados daquele, guia, que anteriormente demonstrou ter alguma atividade sobre o organismo em estudo. Através dessa triagem inicial, vários parâmetros podem ser observados, visando à avaliação da viabilidade do organismo-alvo (KATZ, 2008).

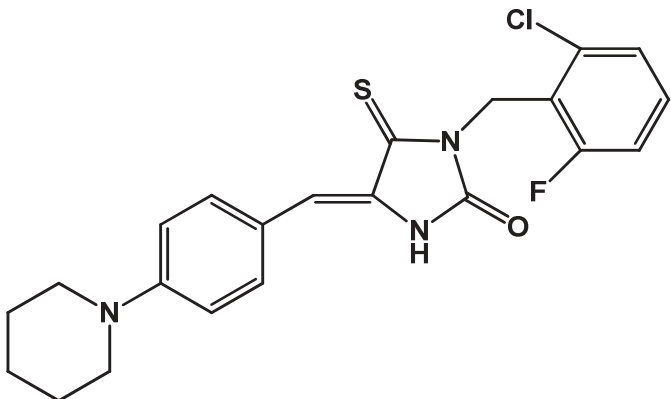
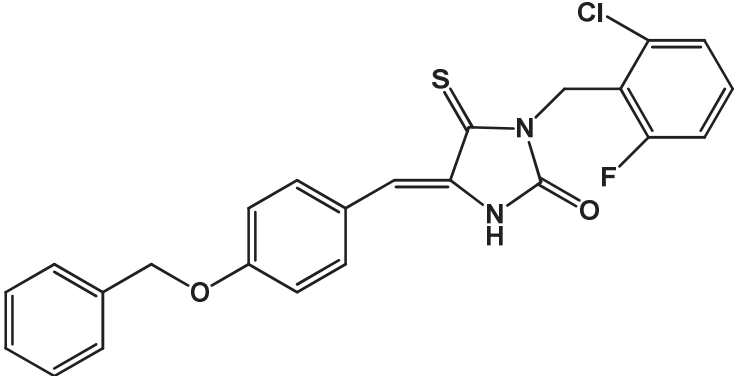
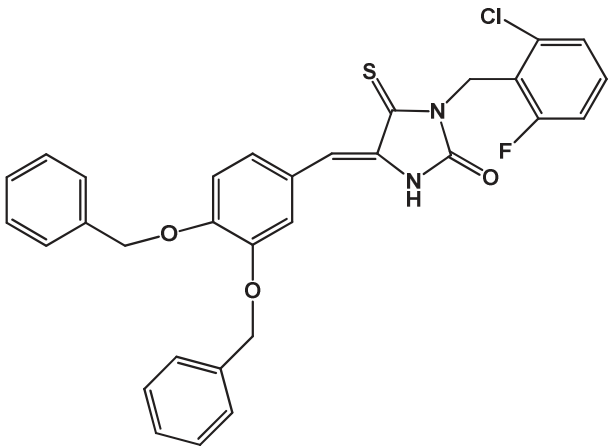
A semelhança estrutural dos novos derivados tioxo-imidazolidínicos sintetizados com o niridazol (Ambilhar[®]), quimicamente denominado 1-(5- nitro-tiofeno-3-il)-imidazolidin-2-ona, fármaco de comprovada ação frente ao *S. mansoni* e bastante utilizado no passado como esquistossomicida, embora possuidor de indesejáveis efeitos colaterais, vem se incentivando a pesquisar os efeitos provocados por essas moléculas em vermes adultos de *S. mansoni* mantidos *in vitro* (SILVA, 2004).

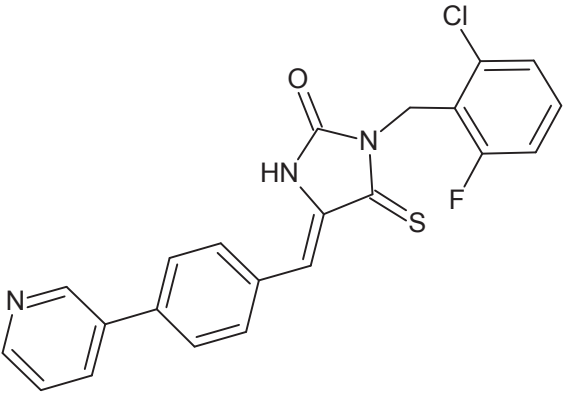
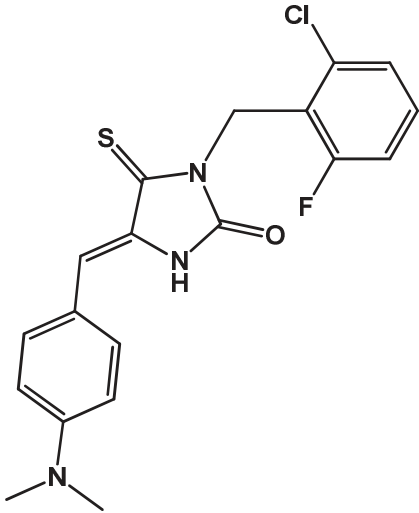
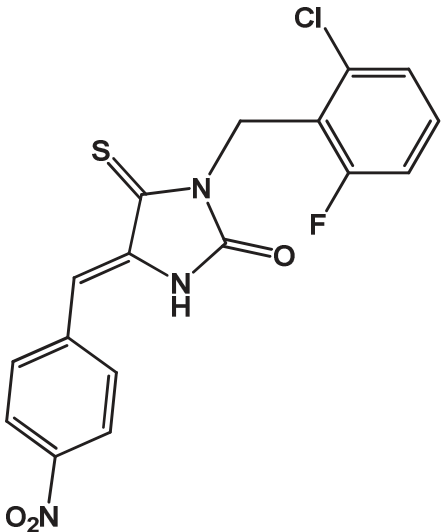
A investigação da atividade biológica de moléculas candidatas a agentes esquistossomicidas é de grande importância para o entendimento da biologia do parasito, podendo ser profilático acarretando a morte de esquistossômulos, supressivo ao inibir a oviposição ou apresentar atividade eficaz ao ser capaz de causar a morte do verme adulto de *S. mansoni* (MORAES, 2012). Nesse contexto, alguns parâmetros precisam ser avaliados, sendo eles atividade motora, acasalamento, oviposição, mortalidade, bem como suas alterações tegumentares a fim de analisar o efeito biológico do composto frente ao parasito (KATZ, 2008).

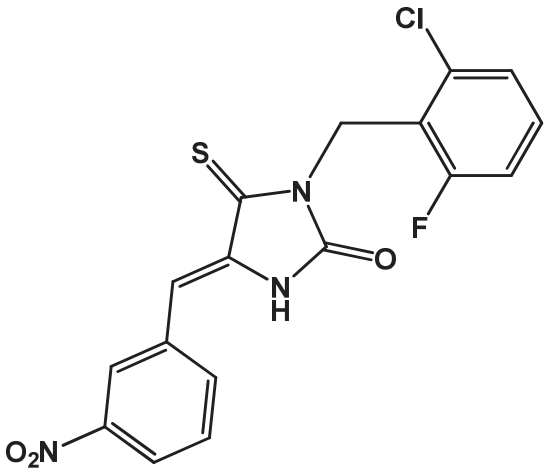
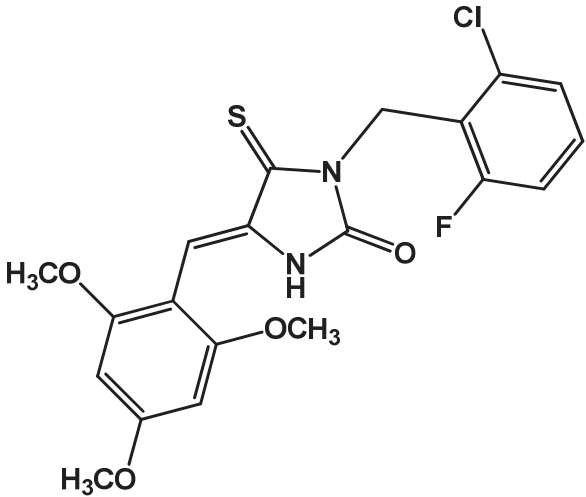
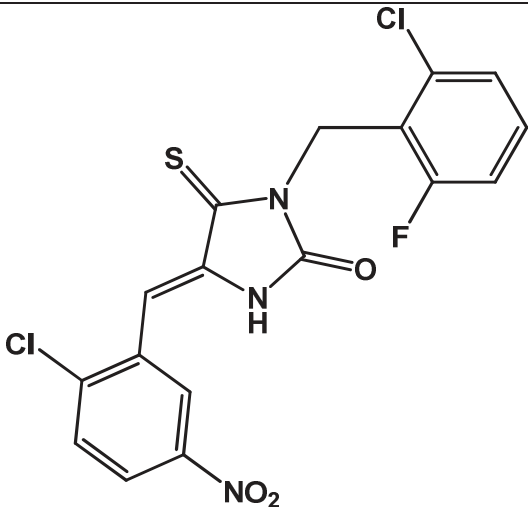
Na busca por moléculas com atividade esquistossomicida, os derivados tioxo-imidazolidínicos são bem conhecidos pela sua atividade em alguns trabalhos que analisaram sua eficácia *in vitro* (ALBUQUERQUE et al., 1999; PITTA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2004; NEVES et al., 2010; NEVES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015) e *in vivo* (SILVA et al., 2012), apresentando assim, resultados bem interessantes. Nesse estudo, foi observada a mortalidade de vermes adultos de *S. mansoni*, após a adição dos compostos LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS10, LPSF/PTS18, LPSF/PTS19,

LPSF/PTS23 e LPSF/PTS24, durante 120 horas de observação. Até a presente data, não foram relatados ensaios de atividade esquistossomícida com derivados aqui investigados sobre vermes adultos de *S. mansoni* (Quadro 4).

Quadro 4 – Relação entre derivados tioxo-imidazolidínicos e resposta biológica frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

DERIVADO TIOXO-IMIDAZOLIDÍNICO	RESPOSTA BIOLÓGICA
	LPSF/PTS2 Citotoxicidade: > 100 μM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: > 80 μM
	LPSF/PTS4 Citotoxicidade: > 100 μM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: > 80 μM
	LPSF/PTS5 Citotoxicidade: > 10 μM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade:-

DERIVADO IMIDAZOLIDÍNICO	RESPOSTA BIOLÓGICA
	LPSF/PTS6 Citotoxicidade: > 10 μM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade:-
	LPSF/PTS10 Citotoxicidade: > 100 μM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: 20 μM
	LPSF/PTS18 Citotoxicidade: > 10 μM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: -

DERIVADO IMIDAZOLIDÍNICO	RESPOSTA BIOLÓGICA
	LPSF/PTS19 Citotoxicidade: > 10 μM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterada Mortalidade: -
	LPSF/PTS23 Citotoxicidade: > 100 μM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: > 5 μM
	LPSF/PTS24 Citotoxicidade: > 100 μM Oviposição: Inibido Acasalamento: vermes separados Motilidade: Alterado Mortalidade: > 20 μM

No que diz respeito à citotoxicidade, os derivados tioxo-imidazolidínicos LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS10, LPSF/PTS23 e LPSF/PTS24 não exibiram citotoxicidade em concentrações até 100µM. Demonstrando que a inclusão dos grupos 4-piperidin, 4-benziloxi, 4-dimetilamina, 2,4,6-trimetoxi e 2-cloro-5-nitro no anel benzilideno podem ter interferido nessa citotoxicidade.

Por outro lado, os derivados LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 e LPSF/PTS19 apresentaram citotoxicidade em concentrações superiores a 10 µM, possivelmente associada com a inclusão de substituintes como 3,4-dibenziloxi, 4-nitro e 3-nitro, respectivamente.

A introdução do radical nitro no benzilideno aparenta influenciar na citotoxicidade da molécula, tendo em vista que os derivados PTS-18 e PTS-19 apresentaram uma alta citotoxicidade. O radical nitro é conhecido na literatura como um radical citotóxico. A introdução de radicais volumosos não aparenta favorecer a atividade da molécula, como no caso dos derivados LPSF/PTS2 e LPSF/PTS4, tendo em vista que os derivados apresentaram uma baixa atividade (McMURRY, 2011; BRUICE, 2006).

A melhor substituição para o benzilideno foi apresentada pelo derivado LPSF/PTS23, com a introdução dos grupamentos metoxila. Quimicamente os radicais metoxila são conhecidos por possuírem um efeito mesomérico positivo, aumentando a densidade eletrônica do anel, e também podem se portar como aceptores de ligações de hidrogênio (McMURRY, 2011; BRUICE, 2006).

Embora o derivado LPSF/PTS24 também apresente nitro na posição 5 da imidazolidina, este por sua vez também apresenta o átomo de cloro na posição 2 do anel imidazolidínico. Essa porção apresenta um efeito indutivo negativo sobre o anel. Isso acontece porque o átomo de cloro é mais eletronegativo que o carbono, facilitando a retirada dos elétrons do anel, aumentando sua nuvem eletrônica e um caráter ácido dessa porção da molécula (McMURRY, 2011; BRUICE, 2006). Os halogênios são eficientes em melhorar a absorção dos derivados em meio biológico, mais precisamente nas membranas celulares, porém mostram uma predisposição desses fármacos halogenados de se acumularem no tecido adiposo dos organismos tratados (THOMAS, 2003).

No que diz respeito aos ensaios de atividade esquistossomicida *in vitro*, LPSF/PTS23, composto com grupo metoxila ligado na posição 2,4,6 substituído no anel benzilidênico, mostrou-se o mais ativo entre os compostos avaliados, causando mortalidade de 100% até 120 horas em concentrações variando de 5 a 100 µM.

Estes resultados sugerem que a eficácia varia de acordo com o substituinte na posição 4 do grupo imidazolidina. O composto LPSF/PTS23 tem um grupo de metoxila ligado na

posição 2.4.6 do anel imidazolidínico. Os achados da literatura, também mostrou que os compostos heterocíclicos contendo um grupo metoxila exibiram maior atividade esquistossomicida do que compostos sem este grupo (SANTIAGO et al., 2014).

Enquanto que LPSF/PTS24, não causou efeitos deletérios nos vermes adultos de *S. mansoni* na mesma proporção, embora tenha provocado redução na motilidade e inibição da oviposição. A adição do grupo 4-dimetilamina no composto LPSF/PTS10, provocou um aumento da susceptibilidade dos vermes adultos de *S. mansoni*, ocasionando mortalidade nas primeiras 24 horas.

Resultados obtidos com estes derivados foram semelhantes com os observados com o derivado (3-(4-cloro-benzil)-1-metil-5-(4-metóxi-benzilideno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona) LPSF/JT-69, e apresentaram eficácia de 100% de mortalidade dos parasitos nas primeiras 72h de contato com o derivado, na concentração de 322 μ M (PITTA et al., 2006).

LPSF/PTS2, composto com grupo 4-piperidin, LPSF/PTS4, composto com grupo 4-benziloxi, substituídos no anel benzilidênico, causaram mortalidade de 100% até 120 horas em concentrações apenas nas concentrações de 80 e 100 μ M, e essa mortalidade foi diminuindo com a redução da concentração dos derivados durante a realização do experimento.

Já LPSF/PTS5, composto com grupo 3,4-dibenziloxi, LPSF/PTS18, composto com grupo 4-nitro e LPSF/PTS-19 com o grupo 3-nitro, todos substituídos no anel benzilidênico, mostraram-se menos ativos entre os compostos avaliados, causando mortalidade de 50% ao final de 120 horas na concentração de 10 μ M. Estes compostos foram avaliados apenas na concentração de 10 μ M, uma vez que a adição desses grupos ao anel benzilidênico tornou estes mais citotóxicos.

Os vermes adultos de *S. mansoni*, principalmente os vermes machos, apresentam uma variedade de movimentos entre os quais, rápidos encurtamentos e prolongamento do corpo, movimentos ondulatórios e ondas peristálticas, parcial ou de uma extremidade a outra (DA SILVA; NOEL, 1995). A motilidade do *S. mansoni*, e o efeitos de compostos esquistossomicida sobre essa atividade, baseiam-se, principalmente, na observação visual. A análise macroscópica da atividade motora, apresenta a vantagem de ser um método simples, direto, de baixo custo e facilidade operacional (NOEL, 2008; MORAES, 2011).

Nesse estudo, a atividade motora dos vermes adultos de *S. mansoni*, baseada na observação microscópica dos vermes, foi diariamente monitorada qualitativamente definida como “normal”, “com menor perda dos movimentos” e “sem movimentos”. Apesar de subjetivo, esse critério qualitativo é comumente empregado nos ensaios *in vitro* (MORAES,

2011; MORAES et al., 2012; MORAES et al., 2013; MATOS-ROCHA et al., 2013). Nos experimentos realizados no estudo, comparativamente aos vermes adultos incubados apenas em meio de cultura, a motilidade dos parasitos foi alterada quando incubados na presença dos derivados tioxo-imidazolidínicos. Foi descrito também, que os compostos tioxo-imidazolidínicos que foram letais para os vermes adultos, independentemente do tempo de incubação. Nesse mesmo estudo, observou-se que, nenhum dos derivados induziu a contração muscular nos parasitos. Por outro lado, PZQ induziu, nos instantes iniciais, contração dos helmintos e redução na motilidade sem a separação dos pares de vermes adultos de *S. mansoni*, achados esses também observados no estudo realizado por Moraes (2011).

Em *S. mansoni* o controle da atividade motora ocorre por diversos neurotransmissores ou neuromoduladores, tais como: os pertencentes ao grupo de mediadores do tipo amina (serotonina, dopamina, noradrenalina, adrenalina, acetilcolina); aos do tipo aminoácidos (glutamato, γ -ácido aminobutírico-GABA) e aos neuropeptídeos (peptídeos da família FMRF-amidas - FaRPs) (MAIR et al., 2000; MENDONÇA-SILVA et al., 2004).

Cada um desses neurotransmissores/neuromoduladores atua de formas diferentes na motilidade aumentando-a (serotonina), diminuindo-a (acetilcolina) ou mantendo-a constante (dopamina, noradrenalina, adrenalina, glutamato e GABA). Assim, a partir da movimentação que o verme adquire após a adição de uma amostra a ser testada, ocorrem evidências farmacológicas da presença desses neurotransmissores no meio de incubação (NOEL, 2008).

Desta forma, os neurotransmissores são possíveis alvos de agentes esquistossomicidas, sobretudo depois de ter sido mostrado que agonistas/antagonistas desses sistemas produziram alterações no padrão de motilidade dos vermes (SANGSTER; SONG; DEMELER, 2005; NOEL et al., 2008). Sugere-se que alguns compostos esquistossomicidas como oxaminiquina, metrifonato, hancantona, lucantona e imidazolidinas atuem em neurotransmissores dos vermes adultos de *S. mansoni* (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995; DUBOIS et al., 2009; ALBUQUERQUE et al., 1999; ALBUQUERQUE et al., 2007; PITTA et al., 2006; NEVES et al., 2010; NEVES et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2015). Então, levando em consideração os dados já publicados, é possível que as alterações na atividade motora em vermes adultos de *S. mansoni* em presença de compostos esquistossomicida estejam associados à neurotransmissores ou neuromoduladores (MORAES, 2011).

As manifestações clínicas da esquistossomose estão associadas, principalmente, à presença dos ovos de *S. mansoni*, no tecido do hospedeiro (GRYSEELS et al., 2006). Dessa forma, na busca de compostos para terapêutica experimental deve-se considerar drogas supressoras, que acabem com a oviposição da fêmea e, portanto, eliminem o principal agente

patogênico, o ovo, além de interromper a transmissão dessa parasitose (KATZ, 2008). O objetivo dessa fase da pesquisa foi de avaliar a capacidade reprodutiva de vermes adultos de *S. mansoni* quando em presença de compostos imidazolidínicos. A capacidade reprodutiva de *S. mansoni* foi avaliada pela observação aos efeitos da exposição no acasalamento e oviposição das fêmeas. Nos experimentos, foram observadas inibição da oviposição durante todo período do experimento quando os vermes foram incubados com todos os derivados tioxo-imidazolidínicos empregados nesse estudo, enquanto no grupo controle (vermes não tratados) foi observada a oviposição e se os vermes permaneceram viáveis durante o período de observação. Alguns estudos relatam através de experimentos *in vitro* a redução da oviposição de *S. mansoni* por compostos imidazolidínicos (PITTA et al., 2006; NEVES et al., 2010; NEVES et al., 2011; SILVA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2015).

A redução da oviposição pode ser causada por alterações no sistema reprodutivo de machos e/ou fêmeas (MORAES, 2011). Por exemplo, um estudo sobre o efeito esquistossomicida da lovastatina realizado por Araújo et al. (2002), mostraram que esse medicamento foi capaz de causar redução da oviposição de vermes adultos de *S. mansoni*. Os estudos morfológicos em vermes adultos expostos a lovastatina mostraram alterações degenerativas, sendo as principais no aparelho reprodutor, com redução dos folículos vitelínicos e do ovário das fêmeas e modificações nos testículos dos machos. No estudo não foi verificado se os derivados tioxo-imidazolidínicos causam alterações morfológicas nos órgãos reprodutivos. No entanto, baseado na ausência de ovos observada nos experimentos desse estudo, é provável que os órgãos reprodutores dos vermes adultos de *S. mansoni* tenha afetado a oogênese e/ou espermatogênese.

Não obstante a análise subjetiva para avaliar o efeito de compostos esquistossomicida, sobre o tegumento do *S. mansoni*, esse critério é qualitativo e comumente empregado em ensaios *in vitro* (ALBUQUERQUE et al., 2007; NEVES et al., 2011; SILVA et al., 2014).

No que diz respeito as alterações ultraestruturais, a superfície tegumentar tem sido o alvo biológico bastante importante no combate ao parasito, uma vez que essa estrutura se caracteriza por estar envolvida com a resposta imune do parasito frente ao hospedeiro definitivo, com atividade sensorial e com a capacidade de absorção de nutrientes (XIAO et al., 2002). Os resultados baseados em análises ultraestruturais por MEV demonstraram que vermes adultos após serem incubados com LPSF/PTS23 na concentração de 100 μ M, foi capaz de causar destruição de tegumento, com perda de tubérculos e espinhos, formação de bolhas e destruição da superfície subtegumentar nos vermes adultos machos do *S. mansoni*.

O mesmo resultado foi observado em trabalhos anteriores com compostos tioxo-imidazolidínicos (PITTA et al., 2006; ALBUQUERQUE et al., 2007; NEVES et al., 2011; SILVA et al., 2014). Sendo assim, suspeita-se que, de alguma forma, LPSF/PTS23 atue no sistema tegumentar, interferindo nas células do tegumento, porém, esse mecanismo também ainda não foi totalmente elucidado no estudo.

Neves et al. (2010; 2011) realizando avaliando *in vitro* a atividade esquistossomicida dos compostos LPSF/RZS-2, LPSF/RZS-5, LPSF/PT-11, LPSF/PT-05, através de análises de microscopia eletrônica de varredura e citotoxicidade, demonstraram que esses compostos foram capazes de apresentar resultados semelhantes ao PZQ com 100% de mortalidade dos vermes adultos *S. mansoni* nas primeiras 24 horas de contato com o composto. O composto LPSF/PTS23 avaliado no estudo demonstrou resultados semelhantes aos dos compostos citados acima.

Os derivados (Z)-3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ-4), (Z)-3-(4-cloro-benzil)-5-(4-fluoro-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/JT-59) e (Z)-5-(4-fluoro-benzilidene)-1-metil-3-(4-fenil-benzil)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/JT-62) induziram mudanças significativas na superfície tegumentar do corpo dos parasitos adultos do *S. mansoni*, causando danos tegumentares com contração corporal e das ventosas ventral e oral, desorganização e colapso total dos tubérculos com perda de espinhos (ALBUQUERQUE et al., 2005). O radical nitro, flúor e fenil, presentes nos derivados imidazolidínicos desse trabalho contribuíram para melhorar a eficácia dos compostos frente ao *S. mansoni* (PAULA, SERRANO; TAVARES, 2009; THOMAS, 2003).

Resultados promissores com outros compostos imidazolidínicos apresentando o cloro e o flúor em sua estrutura também foram capazes de acarretar alterações ultraestruturais no tegumento dos vermes adultos do *S. mansoni*, como os derivados 1-benzil-4-[(4-cloro-fenil)-hidrazono]-5-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT-5) e 1-(4-cloro-benzil)-4-[(4-fluoro-fenil)-hidrazono]-5-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT-11). Segundo Thomas (2003), os halogênios têm a capacidade de melhorar a absorção dos derivados pelas membranas celulares. Dessa forma, isso pode ter acontecido na superfície tegumentar do *S. mansoni* incubado com os compostos acima bem como com o composto LPSF/PTS23 que apresenta os halogênios flúor em sua estrutura química.

O mecanismo de ação dos derivados tioxo-imidazolidínicos ainda não está totalmente elucidado. Porém, há evidências de que esses compostos atuem nos níveis de receptores colinérgicos (THIBAUT et al., 2009).

Novos estudos devem ser realizados a fim de elucidar o mecanismo de ação dos derivados avaliados, bem como da LPSF/PTS23 sobre o *S. mansoni*. Verificar a atividade esquistossomicida em testes *in vivo* pode ser útil para investigar suas ações no hospedeiro, o que deve proporcionar novas perspectivas para o controle alternativo de parasito e desenvolvimento de medicamentos eficazes contra a esquistossomose.

7. CONCLUSÃO

- ✓ Os derivados tioxo-imidazolidínicos LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS10, LPSF/PTS23 e LPSF/PTS24 não foram citotóxicos nas concentrações avaliadas.
- ✓ Os derivados tioxo-imidazolidínicos LPSF/PTS2, LPSF/PTS4, LPSF/PTS10 e LPSF/PTS23 foram os compostos mais ativos nos ensaios de viabilidade *in vitro* em vermes adultos de *S. mansoni*.
- ✓ Os derivados LPSF/PTS5, LPSF/PTS6, LPSF/PTS18 e LPSF/PTS19, embora não tenham causado mortalidade, foram capazes de causar alteração de motilidade, inibição de oviposição e acasalamento dos vermes.
- ✓ Com relação às alterações tegumentares, foi possível observar alterações como destruição de tubérculos com perda de espinhos e formação de vesículas nos vermes machos, e, erosão do tegumento nos vermes fêmeas em vermes adultos de *S. mansoni* após incubação com LPSF/PTS23.
- ✓ A presença do grupo metoxila no derivado LPSF/PTS23 conferiu melhor atividade esquistossomicida *in vitro*.
- ✓ A alta taxa de mortalidade, aliadas as alterações no acasalamento e oviposição, e os danos causados no tegumento dos parasitos colocam a LPSF/PTS23 como um promissor agente esquistossomicida.

8. PERSPECTIVAS

- ✓ Avaliar a atividade *in vitro* do derivado tioxo-imidazolidínico LPSF/PTS23 frente miracídeos, cercarias e vermes imaturos de *Schistosoma mansoni*;
- ✓ Avaliar a atividade *in vivo* de LPSF/PTS23 em camundongos infectados por *Schistosoma mansoni*;
- ✓ Elucidar um possível mecanismo de ação do composto LPSF/PTS23.

9. REFERÊNCIAS

- ABDUL-GHANI, R. A.; LOUTFY, N.; HASSAN, A. Experimentally promising antischistosomal drugs: a review of some drug candidates not reaching the clinical use. *Parasitol Res*, v. 105, n. 4, p. 899-906, 2009.
- AIRES, A. L.; XIMENES, E. C. P. A.; SILVA, R. A. R.; BARBOSA, V. X.; GÓES, A. J. X.; PEIXOTO, C. A.; SOUZA, V. M. O.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. Ultrastructural analysis of b-lapachone-induced surface membrane damage in male adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Exp Parasitol*, v. 142, p. 83-90, 2014.
- ALLAM, G.; ABUELSAAD, A. S. *In vitro* and *in vivo* effects of hesperidin treatment on adult worms of *Schistosoma mansoni*. *J Helminthol*, v. 88, n. 3, p. 362-370, 2014.
- ALBUQUERQUE, J. F. C.; ROCHA FILHO, J. A.; BRANDAO, S. S.; LIMA, M. C.; XIMENES, E. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; CHANTEGREL, J.; PERRISSIN, M.; LUU-DUC, C. Synthesis and antimicrobial activity of substituted imidazolidinediones and thioxoimidazolidinones. *Il Farmaco*, v. 54, n. 1/2, p. 77-82, 1999.
- ALBUQUERQUE, M. C. A.; SILVA, T. G.; PITTA, M. G. R.; SILVA, A. C. A.; SILVA, P. G.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; WANDERLEY, A. G.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; BARBE, J.; PITTA, I. R. Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioxoimidazolidine compounds. *Pharmazie*, v. 60, n. 1, p. 13-17, 2005.
- ALBUQUERQUE, M. C. A.; PITTA, M. G. R.; IRMÃO, J. I.; PEIXOTO, C. A.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R. Tegumental Alterations in Adult *Schistosoma mansoni* Treated with Imidazolidine Derivatives. *Lat Am J Pharm*, v. 26, n. 1, p. 65-69, 2007.
- ALGER, H. M.; SAYED, A. A.; STADECKER, M. J.; WILLIAMS, D. L. Molecular and enzymatic characterisation of *Schistosoma mansoni* thioredoxin. *Int J Parasitol*, v. 32, p. 1285-1292, 2002.
- ANGELUCCI, F.; MIELE, A. E.; BOUMIS, G.; BRUNORI, M.; DIMASTROGIOVANNI, D.; BELLELLI, A. Macromolecular bases of antischistosomal therapy. *Curr Top Med Chem*, v. 11, n. 16, p. 2012-2028, 2011.
- ARAÚJO, N.; KOHN, A.; OLIVEIRA, Á. A.; KATZ, N. *Schistosoma mansoni*: ação da lovastatina no modelo murino. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 35, p. 35-38, 2002.
- BARTH, L. R.; FERNANDES, A. P.; RODRIGUES, V., 1996. Oviposition by *Schistosoma mansoni* during *in vitro* cultivation. *Rev Inst Med Trop*, v. 38, p. 423-426
- BARROS, C. D.; AMATO, A. A.; OLIVEIRA, T. B.; IANNINI, K. B. R.; SILVA, A. L.; SILVA, T. G.; LEITE, E. S.; HERNANDES, M. Z.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; NEVES, F. A. R.; PITTA, I. R. Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPARc ligands. *Bioorg Med Chem*, v. 18, p. 3805-3811, 2010.

BECK, L.; VAN-LÜME D.S.M.; SOUZA, J.R.; DOMINGUES, A.L.C., FAVRE, T.; ABATH, F.G.C.; MONTENEGRO, S.M.L. Discriminating acute from chronic human *Schistosomiasis mansoni*. *Acta Tropica*, v. 108, p. 229-233, 2008.

BERTÃO, H. G.; SILVA, R. A. R.; PADILHA, R. J. R.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Parasitol Res*, v. 110, p. 2465-2473, 2012.

BETHONY, J. M.; COLE, R. N.; GUO, X.; KAMHAWI, S.; LIGHTOWLERS, M. W.; LOUKAS, A.; PETRI, W.; REED, S.; VALENZUELA, J.G.; HOTEZ, P. J. Vaccines to combat the neglected tropical diseases. *Immunol Res*, v. 239, p. 237-270, 2011.

BOGHDADI, G.; KHALIK, D. A.; WAHAB, A. S.; FARGHALY, A. Immunomodulatory effect of R848 on cytokine production associated with *Schistosoma mansoni* infection. *Parasitol Res*, v. 112, n. 1, p. 135-140, 2013.

BRANDÃO, S. S. F.; ANDRADE, A. M. C.; PEREIRA, D. T. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; BARBE, J. A novel way of synthesis of 1,3,5-trisubstituted-2-thioxoimidazolidinones. *Heterocycl Comm*, v. 10, p. 9-14, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância da Esquistossomose Mansoní: diretrizes técnicas / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2014.

BRUICE, P.Y. Química Orgânica. 4ª Edição, 2006.

CAFFREY, C. R.; MCKERROW, J. H.; SALTER, J. P.; SAJID, M. Blood ‘n’ guts: an update on schistosome digestive peptidases. *Trends parasitol*, v. 20, n. 5, p. 241-248, 2004.

CAFFREY, C. R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Curr opin chem biol*, v. 4, n. 4, p. 433-439, 2007.

CALDEIRA, R. L.; JANNOTTI-PASSOS, L. K.; CARVALHO, O. S.; Molecular epidemiology of Brazilian *Biomphalaria*: A review of the identification of species and the detection of infected snails. *Acta Tropica*, v. 111, n. 1, p. 1-6; 2009.

CAMACHO, M.; TARRAB-HAZDAI, R.; ESPINOZA B, ARNON R, AGNEW A. The amount of acetylcholinesterase on the parasite surface reflects the differential sensitivity of *Schistosoma* species to metrifonate. *Parasitol*, v. 108, p. 153-160, 1994.

CARVALHO, G. S. G.; MACHADO, P. A.; PAULA, D. T. S. COIMBRA, E. S. SILVA, A. D. Synthesis, Cytotoxicity, and Antileishmanial Activity of N,N'-Disubstituted Ethylenediamine and Imidazolidine Derivatives. *Scien Worl J*, v. 10, p. 1723-1730, 2010.

CARVALHO, G. S.; DIAS, R. M.; PAVAN, F. R.; LEITE, C. Q.; SILVA, V. L.; DINIZ, C. G.; PAULA, D. T.; COIMBRA, E. S.; RETAILLEAU, P.; SILVA, A. D. Synthesis, cytotoxicity, antibacterial and antileishmanial activities of imidazolidine and hexahydropyrimidine derivatives. *Med Chem*, v. 9, p. 351-359, 2013.

CASTILHO, M.S.; POSTIGO, M.P.; PEREIRA, H.M.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Structural basis for selective inhibition of purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni*: Kinetic and structural studies. *Bioorg Med Chem*, v. 18, p. 1421-1427, 2010.

CATERINA, M. C.; PERILLO, I. A.; BOIANI, L.; PEZAROGLO, H.; CERECETTO, H.; GONZALEZ, M.; SALERNO, A. Imidazolidines as new anti-*Trypanosoma cruzi* agents: biological evaluation and structure-activity relationships. *Bioorg Med Chem*, v. 16, p. 2226-2234, 2008.

CHAND, B. G.; RAY, U. S.; MOSTAFA, G.; CHENG, J.; LU, T. H.; SINHA, C. Difference in bonding behaviour of azide and thiocyanate to Hg (II)-azoimidazoles. *Inorganica Chim Acta*, v. 358, p. 1927-1933, 2005.

CIOLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitol today*, v. 14, n. 10, p. 418-422, 1998.

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

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. *Parasitol Res*, v. 90, p. 3-9, 2003.

COMBER, R. N.; REYNOLDS, R. C.; FRIEDRICH, J. D.; MANGUIKIAN, R. A.; BUCKHEIT, R. W.; TRUSS, J. W.; SHANNON, W. M.; SECRIST, J. A. 5,5-Disubstituted Hydantoins: Syntheses and Anti-HIV Activity. *J Med Chem*, v. 19, n. 35, p. 356-3572, 1992.

CORTES, S.; LIAO, Z. K.; WATSON, D.; KOHN, H. Effect of Structural Modification of the Hydantoin Ring on Anticonvulsant Activity. *J Med Chem*, v. 28, n. 5, p. 601-606, 1985.

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

DA SILVA, S. P.; NOEL, F. Time course of the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni* attachment *in vitro*: comparison with its effects on worm length and motility. *Parasitol Res*, v. 81, p. 543-548, 1995.

DE OLIVEIRA PENIDO, M. L.; ZECH COELHO, P. M.; DE MELLO, R. T.; PILÓ-VELOSO, D.; DE OLIVEIRA, M. C.; KUSEL, J. R.; NELSON, D. L. Antischistosomal activity of aminoalkanethiols, aminoalkanethiosulfuric acids and the corresponding disulfides. *Acta Trop*, v. 108, n. 2-3, 249-255, 2008.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N.; THIEMANN, O. H.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da Doença de Chagas: Estado da Arte e Perspectivas no Desenvolvimento de Novos Fármacos. *Quím Nova*, v. 15, p. 2444-57, 2009.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J.; Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Curr Opin Infect Dis*, v. 21, n. 6, p. 659-667, 2008.

DUBOIS, F.; CABY, S.; OGER, F.; COSSEAU C, CAPRON M, GRUNAU C, DISSOUS C, PIERCE RJ. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. Mol Biochem Parasitol, v. 168, p. 7-15, 2009.

EL-LAKKANY, N. M.; EL-DIN, S. H. S. Haemin enhances the *in vivo* efficacy of artemether against juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in mice. Parasitol Res, v. 112, n. 5, p. 2005-2015, 2013.

EL RIDI, R. A. F.; TALLIMA, H. A. M. Novel therapeutic and prevention approaches for schistosomiasis: review. J Advanced Res, v. 4, n. 5, p. 467-478, 2013.

FABRI, R. L.; ARAGÃO, D. M.; FLORÊNCIO, J R.; PINTO, N. D. E. C.; MATTOS, A. C.; COELHO, P. M.; CASTAÑON, M. C.; VASCONCELOS, E. G.; PINTO, P. D. E. F.; SCIO, E. Chromatographic fingerprint analysis and effects of the medicinal plant species *Mitracarpus frigidus* on adult *Schistosoma mansoni* worms. Biomed Res Int, v. 2014, p. 9413-9418, 2014.

FAGHIRI, Z.; SKELLY, P. J. The role of tegumental aquaporin from the human parasitic worm, *Schistosoma mansoni*, in osmoregulation and drug uptake. Faseb J, v. 23, p. 2780-2789, 2009.

FALLON, P. G. *Schistosoma* resistance to praziquantel. Drug Resistance Updates, v. 1, p. 236-241, 1998.

FALLON, P. G.; STURROCK, R.F.; NIANG, C.M.; DOENHOFF, M.J. Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. Am J Trop Med Hyg, v. 53, p. 61-62, 1995.

FERNANDES, F. S.; REZENDE JÚNIOR, C. O.; FERNANDES, T. S.; SILVEIRA, L. S.; REZENDE, C. A. M.; ALMEIDA, M. V.; PAULA, R. G.; SILVA FILHO, A. A.; COURI, M. R. C. Anthelmintic Effects of Alkylated Diamines and Amino Alcohols against *Schistosoma mansoni*. BioMed Res Int, v. 2013, p. 1-9, 2013.

FINKBEINER, H. The Carboxylation of Hydantoins. v. 30, p. 3414-3419, 1965.

FILHO, R. P.; SILVEIRA, M. A. B. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Braz J Pharm Sci, v. 37, 2001.

FONSECA, C. T.; BRITO, C. F.; ALVES, J. B.; OLIVEIRA, S. C. IL-12 enhances protective immunity in mice engendered by immunization with recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein through an IFN- γ and TNF- α dependent pathway. Vaccine, v. 22, p. 503-510, 2004.

FLOSI, W. J.; DEGOEY, D. A.; GRAMPOVNIK, D. J.; CHEN, H. J.; KLEIN, L. L.; DEKHTYAR, T.; MASSE, S.; MARSH, K. C.; MO, H. M.; KEMPF, D. Discovery of imidazolidine-2,4-dione-linked HIV protease inhibitors with activity against lopinavir-resistant mutant HIV. Bioorg Med Chem, v. 14, n. 19, 6695-6712, 2006.

FREITAS, R. P. Avaliação da atividade esquistossomocida de análogos sintéticos da piplartina em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. 30 p. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2015.

GOLDING, B. G. DNA and the revolutions of molecular evolution, computational biology, and bioinformatics. *Genome*, v. 46, n. 6, p. 930-935, 2003.

GOMES, F. O. S.; MELO, C. M.; PEIXOTO, C. A.; DE LIMA, M. C, GALDINO, S. L.; PEREIRA, V. R.; DA ROCHA PITTA, I. New imidazolidine derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents: structure–activity relationships. *Parasitol Res.* v.111, n. 6, p. 2361-2366, 2012.

GOUVEIA, F. L.; OLIVEIRA, R. M. B.; OLIVEIRA, T. B.; SILVA, I. M.; NASCIMENTO, S. C.; SENA, K. X. F. R.; ALBUQUERQUE, J. F. C. Synthesis, antimicrobial and cytotoxic activities of some 5-arylidene-4-thioxo-thiazolidine-2-ones. *Eur J Med Chem*, v. 44, p. 2038-43, 2009.

GUARDA, V. L. M.; PEREIRA, M. A.; DE SIMONE, C. A.; ALBUQUERQUE, J. C.; GALDINO, S. L.; CHANTEGREL, J.; PERRISSIN, M.; BENEY, C.; THOMASSON, F.; PITTA, I. R.; LUU-DUC, C. Synthesis and structural study of arylidene thiazolidine and benzothiazine compounds. *Sulfur Letters*, v. 26, p. 17-27, 2003.

GUERRA, A. S. H.; MALTA, D. J.; LARANJEIRA, L. P.; MAIA, M. B.; COLAÇO, N. C.; DE LIMA, M. DO C.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. DA R.; GONÇALVES-SILVA, T. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole–imidazolidine derivatives. *Inter Immunopharmacol*, v. 11, p. 1816-1822, 2011.

GUIDO, R. V. C.; OLIVA, G. Structure-Based Drug Discovery for Tropical Diseases. *Curr Top Med Chem*, v. 9, p. 824-843, 2009.

GREENBERG, R.M.; Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action?. *Int J Parasitol*, v. 35, p. 1-9, 2005.

GRYSEELS, B., POLMAN, K., CLERINX, J., KESTENS, L. Human schistosomiasis. *Lancet*, v. 368, p. 1106-1118, 2006.

HANDZLIK, J.; SZYMANSKA, E.; WOJCIK, R.; DELA, A.; JASTRZEBSKA-WIESEK, M.; KAROLAK-WOJCIECHOWSKA, J.; FRUZINSKI, A. SIWEK, A. FILIPEK, B.; KIEC-KONONOWICZ, K. Synthesis and SAR-study for novel arylpiperazine derivatives of 5-arylidenehydantoin with $\alpha 1$ -adrenoceptor antagonistic properties. *Bioorg Med Chem*, v. 20, p. 4245-4247, 2012.

HORIUCHI, A.; SATOU, T.; AKAO, N.; KOIKE, K.; FUJITA, K.; NIKAIDO, T. The effect of free and polyethylene glycol-liposome-entrapped albendazole on larval mobility and number in *Toxocara canis* infected mice. *Vet Parasitol*, v. 129, n. 1/2, p. 83-87, 2005.

ISMAIL, M.; METWALLY, A.; FARGHALY, A.; BRUCE, J.; TAO, L. F.; BENNETT, J. L. Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. *Am J Trop Med Hyg*, v. 55, n. 2, 214-218, 1996.

ISMAIL, M.; BOTROS, S.; METWALLY, A.; WILLIAM, S.; FARGHALLY, A.; TAO, L. F.; DAY, T. A.; BENNETT, J. L. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *Am J Trop Med Hyg*, v. 60, n. 6, p. 932-935, 1999.

JEZIORSKI, M.C.; GREENBERG, R.M. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: Potential role in praziquantel action. *Int J Parasitol*, v. 36, n. 6, p. 625-632, 2006.

JI, G. C.; ZHOU, S. T.; SHAPIRO, G.; REUBI, J. C.; JURCZYK, S.; CARLTON, S. M. Analgesic activity of a non-peptide imidazolidinedione somatostatin agonist: *In vitro* and *in vivo* studies in rat. *Pain*, v. 124, n. 1/2, p. 34-49, 2006.

KADAN, R.U., ROY, N. Recent Trends in Drug Likeness Prediction: A Comprehensive Review of *In Silico* Methods. *Indian J Pharm Sci*, v. 69, n. 5, p. 609-615, 2007.

KALYAHAM, N.; SPARTHASARATHY, P. C.; ANANTHAN, L.; MANJUNATHA, S. G.; LIKHATE, M. A. Studies on antiamoebic compounds. Iv: synthesis of hexahydropyrimidines and tetrahydroimidazoles. *Indian J Chem*, v. 31, p. 243-247, 1992.

KAMINSKY, D.; ZIMENKOVSKY, B.; LESYK, R. Synthesis and *in vitro* anticancer activity of 2,4-azolidinedione-acetic acids Derivatives. *Eur J Med Chem*, v. 44, n. 9, p. 3627-3636, 2009.

KAPP, K.; KNOBLOCH, J.; SCHUSSLER, P.; SROKA, S.; LAMMERS, R.; KUNZ, W.; GREVELDING, C.G. The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization. *Mol Biochem Parasitol*, v. 138, n. 2, p. 171-182, 2004.

KAROLAK-WOJCIECHOWSKA, J.; SZYMANSKA, E.; MROZEK, A.; KIEC-KONONOWICZ, K. Crystallographic and spectroscopic studies of 5-arylidene-2-aminoimidazol-4-ones. *J Mol Struct*, v. 930, p. 126-134, 2009.

KATZ, N. Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O. S.; COLEHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. (editores) *Schistosoma mansoni* e esquistossomose uma visão multidisciplinar, Fiocruz, p. 823-847, 2008.

KOROLKOVAS, A. Fundamentos de farmacologia molecular: base para o planejamento de fármacos. Editora da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1974.

KOUNI, M. H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacol Ther*, v. 99, n. 3, p. 283-309, 2003.

KNOBLOCH, J.; KUNZ, W.; GREVELDING, C.G. Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. *Int J Parasitol*, v. 36, n. 12, p. 1261-1272, 2006.

KNOBLOCH, J.; WINNEN, R.; QUACK, M.; KUNZ, W.; GREVELDING, C.G. A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. *Gene*, v. 294, n. 1/2, p. 87-97, 2002.

- LAMBERTUCCI, J. R.; SERUFO, J. C.; GERSPACHER-LARA, R.; RAYES, A. A. M.; TEIXEIRA, R.; NOBRE, V.; ANTUNES, C. M. F. *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta Tropica*, v. 77, n. 1, p. 101-109, 2000.
- LIMA, C. M.; FREITAS, F. I.; MORAIS, L. C.; CAVALCANTI, M. G.; SILVA, L. F.; PADILHA, R. J.; BARBOSA, C. G.; SANTOS, F. A.; ALVES, L. C.; DINIZ, M. F. Ultrastructural study on the morphological changes to male worms of *Schistosoma mansoni* after *in vitro* exposure to allicin. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 44, n. 3, p. 327, 2011.
- MAIR, G. R.; MAULE, A. G.; DAY, T. A.; HALTON, D. W. A confocal microscopical study of the musculature of adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitol*, v. 121, n. 2, p. 163-170, 2000.
- MAGALHÃES, L. G.; MACHADO, C. B.; MORAIS, E. R.; MOREIRA, E. B.; SOARES, C. S.; DA SILVA, S. H.; DA SILVA FILHO, A. A.; RODRIGUES, V. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitol Res*, v. 104, n. 5, p. 1197-1201, 2009.
- MAGALHÃES, L. G.; SOUZA, J. M.; WAKABAYASHI, K. A. L.; LAURENTIZ, R. S.; VINHO, L. I. S.; REZENDE, K. C. S.; SIMARO, G. V.; BASTOS, J. K.; RODRIGUES, V.; ESPERANDIM, V. R.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A. *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*, v. 110, n. 5, p. 1747-1754, 2012.
- MANNHOLD, M.; KUBINYI, R.; FOLKERS, G. *Bioisosteres in Medicinal Chemistry*. First Edition, Wiley-VCH, p. 3-14, 2012.
- MARTIN, R. J. Mode of action of anthelmintic drugs. *Vet J*, v.154, p. 11-34, 1997.
- MATOS-ROCHA, T. J.; CAVALCANTI, M. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LÚCIO, A. S.; VERAS, D. L.; FEITOSA, A. P.; SIQUEIRA JÚNIOR, J. P.; ALMEIDA, R. N.; MARQUES, M. O.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A. *In vitro* evaluation of schistosomicidal activity of essential oil of *Mentha x villosa* and some of its chemical constituents in adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Planta Med*, v. 79, p. 1307-1312, 2013.
- MENDONÇA-SILVA, D. L.; PESSÔA, R. F.; NOEL, F. Evidence for the presence of glutamatergic receptors in adult *Schistosoma mansoni*. *Biochem Pharmacol*, v. 64, n. 2, p. 1337-1344, 2002.
- MENDONÇA-SILVA, D. L.; GARDINO, P. F.; KUBRUSLY, R. C.; DE MELLO, F. G.; NOËL, F. Characterization of a GABAergic neurotransmission in adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitol*, v. 129, n. 2, p. 1-10, 2004.
- MELMAN, S. D.; STEINAUER, M. L.; CUNNINGHAM, C.; KUBATKO, L.S.; MWANGI, I. N.; WYNN, N. B.; MUTUKU, M. W.; KARANJA, D. M. S.; COLLEY, D. G.; BLACK, C. L.; SECOR, W. E.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S. Reduced susceptibility to praziquantel among naturally occurring Kenyan isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 8, p. 1-8, 2009.

MORGAN, J. A. T.; DEJONG, R. J.; SNYDER, S. D.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. *Parasitol*, v. 123, p. S211-S228, 2001.

MOURÃO, R. H.; SILVA, T. G.; SOARES, A. L. M.; VIEIRA, E. S.; SANTOS, J. N.; LIMA, M. C. A.; LIMA, V. L. M.; GALDINO, S. L.; BARBE, J.; PITTA, I. R. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. *Eur J Med Chem*, v. 40, p. 1129-1133, 2005.

MORAES, J. Efeito *in vitro* de extratos de compostos naturais em *Schistosoma mansoni*. 267 p. Tese. (Doutorado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

MORAES, J. Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens. In: Rodriguez-Morales, A.J. (Ed.), *Curr Top Trop Med*, v. 1, p. 333-358, 2012.

MORAES, J.; CARVALHO, A. A.; NAKANO, E.; ALMEIDA, A. A.; MARQUES, T. H.; ANDRADE, L. N.; FREITAS, R. M.; SOUSA, D. P. Anthelmintic activity of carvacryl acetate against *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*, v. 112, n. 2, p. 603-610, 2013.

MOSER, D.; TENDLER, M.; GRIFFITHS, G.; KLINKERT, M. Q. A 14-kDa *Schistosoma mansoni* polypeptide is homologous to a gene family of fatty acid binding proteins. *Bio Chem*, v. 266, n. 13, p. 8447-8454, 1991.

MUDDU, A.K.; GUHA, I.N.; ELSHARKAWY, A.M.; MANN, D. A. Resolving fibrosis in the diseased liver: translating the scientific promise to the clinic. *Int J Biochem Cell Biol*, v. 39, n. 4, p. 695-714, 2007.

McMURRY, J. Química Orgânica, v. 1, Cengage Learning, São Paulo, 2011.

NASCIMENTO, G. L.; OLIVEIRA, M. R. Severe forms of schistosomiasis mansoni: epidemiologic and economic impact in Brazil, 2010. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, v. 108, n. 1, p. 29-36, 2014.

NAHED, H. A., RIAD, H. A. T., YOMNA, I. M. Effects of garlic on albino mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*: A parasitological and ultrastructural study. *Trop Biomed*, v. 26, p. 40-50, 2009.

NEVES, J. K. A. L. Imidazolidinas esquistossomicidas: avaliação ultraestrutural, atividade citotóxica e imunomoduladora. 167 p. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2010.

NEVES, J. K.; BOTELHO, S. P.; DE MELO, C. M.; PEREIRA, V. R.; DE LIMA, M. C.; PITTA, I. R.; ALBUQUERQUE, M. C.; GALDINO, S. L. Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*, v. 107, n. 3, p. 531-538, 2010.

NEVES, J. K.; SARINHO, S.; DE MELO, C. M.; PEREIRA, V. R.; DE LIMA, M. C.; PITTA, I. R.; ALBUQUERQUE, M. C.; GALDINO, S. L. Immunological studies and *in vitro* schistosomicide action of new imidazolidine derivates. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, v. 17, n. 3, p. 277-286, 2011.

NEVES, J. K.; LIMA, M. C. A.; PEREIRA, V. R.; MELO, C. M.; PEIXOTO, C. A.; PITTA, I. R.; ALBUQUERQUE, M. C.; GALDINO, S. L. Antischistosomal action of thioxo-imidazolidine compounds: An ultrastructural and cytotoxicity study. *Exp Parasitol*, v. 128, n. 1, p. 82-90, 2011.

NOEL, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade do verme adulto. In: Carvalho, O. S.; Coelho, P. M. Z.; Lenzi, H. L. *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: Uma interdisciplinary vision. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 207-44, 2008.

NOEL, F. Sist. Neuromuscular e controle da motilidade no verme adulto. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose, uma visão multidisciplinar. Cap. 6, 2008.

OLIVEIRA, S. M., ALBUQUERQUE, M. C. P. A., PITTA, M. G. R., MALAGUEÑO, E., SANTANA, J. V., LIMA, M. C. A., PITTA, I. R., GALDINO, S. L. Resposta do *Schistosoma mansoni* mantido *in vitro* frente a derivados imidazolidinônicos. *Acta Farm Bon*, v. 23, n. 3, p. 343-348, 2004.

OLIVEIRA, S. M.; SILVA, J. B. P.; HERNANDES, M. Z.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. *Quím. Nova*, v.31, n.3, p. 614-622, 2008.

OLIVEIRA, R. N.; REHDER, V. L.; SANTOS OLIVEIRA, A. S.; JÚNIOR, Í. M.; CARVALHO, J. E.; DE RUIZ, A. L.; JERALDO, V. L.; LINHARES, A. X. ALLEGRETTI, S. M. *Schistosoma mansoni*: *in vitro* schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. *Exp Parasitol*, v. 132, n. 2, p. 135-143, 2012.

OLIVEIRA, J. F.; SILVA, A. L.; ALMEIDA JUNIOR, A. S. A.; SANTIAGO, E. F.; OLIVEIRA, S. A.; SILVA, V. B. R.; SILVA, A. C.; BARROS, A. F.; PEREIRA, V. R. A.; PITTA, I. R.; LIMA, M. C. A. Synthesis and Evaluation of the Schistosomicidal and Trypanocidal Properties of Thioxo-Imidazolidines and Thiazolidin-2, 4-Diones. *British J Pharm Res*, v. 7, p. 386-400, 2015.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspects of bioactivity and toxicity of nitrocompounds. *New Quim*, v. 32, p. 1013-1020, 2009.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. *Quim. Nova*, v. 30, n. 1, p. 171-177, 2007.

PEREIRA, M. C.; CARDOSO, P. R.; DA ROCHA, L. F.; RÊGO, M. J.; GONÇALVES, S. M.; SANTOS, F. A.; GALDINO-PITTA, M. R.; DANTAS, A. T.; DUARTE, Â. L.; PITTA, M. G. Simvastatin inhibits cytokines in a dose response in patients with rheumatoid arthritis. *Inflamm Res*, v. 63, n. 4, p. 309-315, 2014.

PEREIRA, A. S.; PADILHA, R. J.; LIMA-FILHO, J. L.; CHAVES, M. E. Scanning electron microscopy of the human low-density lipoprotein interaction with the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*, v. 109, n. 5, p. 1395-1402, 2011.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. *Int J Parasitol*, v. 34, n. 4, p. 527-533, 2004.

PICA-MATTOCCIA, L.; ORSINI, T.; BASSO A., FESTUCCI, A., LIBERTI, P., GUIDI, A., MARCATTO-MAGGI, A., NOBRE-SANTANA, S., TROIANI, A., CIOLI, D., VALLE, C. *Schistosoma mansoni*: Lack of correlation between praziquantel-induced intra-worm calcium influx and parasite death. *Exp Parasitol*, v. 119, n. 3, p. 332-335, 2008.

PITTA, I. R.; LIMA, M. C. A.; ALBUQUERQUE, M. C. P.; GALDINO, S. L. Braz. Patent PI, PI-0305000-9, 2005; 25.

PITTA, M. G. R.; SILVA, A. C. A.; NEVES, J. K. A. L.; SILVA, P. G.; IRMÃO, J. I.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J. V.; LIMA, M. C. A.; GALDINO, S. L.; PITTA, I. R.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for Antischistosomal drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 101, n. 1, p. 313-316, 2006.

PITTA, M. G. R.; PITTA, M. G. R.; RÊGO, M. J. B. M.; GALDINO, S. L. The evolution of drugs on schistosoma treatment: looking to the past to improve the future. *Mini Rev Med Chem*, v. 13, n. 4, p. 493-508, 2013.

PORDEUS, L. C.; AGUIAR, L. R.; QUININO, L. R. M.; BARBOSA, C.S. The Occurrence of Acute and Chronic Forms of the Schistosomiasis Mansonic in Brazil from 1997 to 2006: A Revision of Literature. *Epidemiol Serv Saúde*, v. 17, n. 3, p. 163-175, 2008.

RAPADO, L. N. Obtenção e avaliação da atividade de compostos isolados de Piper em modelos biológicos para controle da esquistossomose mansônica. 50 f. Tese. (Doutorado em Biotecnologia). Universidade de São Paulo. São Paulo, 2011.

RÊGO, M. J. B. M.; GALDINO-PITTA, M. R.; PEREIRA, D. T. M.; SILVA, J. C.; RABELLO, M. M.; LIMA, M. C. A.; HERNANDES, M. Z.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; PITTA, M. G. R. Synthesis, *in vitro* anticancer activity and *in silico* study of new disubstituted thiazolidinedione derivatives. *Med Chem Res*, v. 23, p. 3220-3226, 2014.

REY, L. *Parasitologia* 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A. 2008.

RIBEIRO, F.; VIEIRA, C. S.; FERNANDES, A.; ARAUJO, N.; KATZ, N. The effects of immunization with recombinant Sm14 (rSm14) in reducing worm burden and mortality of mice infected with *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 35, n. 1, p. 11-17, 2002.

RIBEIRO, A. G. Epidemiologia da Esquistossomose no Município de Itajubá-MG. 86 p. Dissertação. (Mestrado em Meio Ambiente e Recursos Hídricos). Universidade Federal de Itajubá, Minas Gerais, 2013.

ROBERTSON, A. S.; RENSLO, A. R. Drug discovery for neglected tropical diseases at the Sandler Center. *Future Med Chem*, v. 3, n. 10, p. 1279-1288, 2011.

RONKETTI, F.; RAMANA, A.V.; CHAO-MING, X.; PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D.; TODD, M.H.; Praziquantel derivatives I: Modification of the aromatic ring, *Bioorg Med Chem Lett*, v. 17, p. 4154-4157, 2007.

ROSSI, M. H.; ZELNIK, R. Contribuição à química das imidazolidinadionas - síntese de ciclanilide ciclanilideno-hidantoínas. *Arquivos Instituto Biológico*, São Paulo, v. 67. p. 125-130, 2000.

RUMINSKI, P. G. From bench to clinic: bridging the translational gap in neglected disease drug development. *Future Med Chem*, v. 3, n. 10, p. 1253-1257, 2011.

SAHA, A. K.; LIU, L.; SIMONEAUX, R. L.; KUKLA, M. J.; MARICHAL, P.; ODDS, F. Novel Antifungals Based on 4-Substituted Imidazole: A Combinatorial Chemistry Approach to Lead Discovery and Optimization. *Bioorg Med Chem Lett*, v. 10, n. 19, p. 2175-2178, 2000.

SAJID, M.; McKERROW, J. H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 120: 1-21, 2002.

SANGSTER, N. C.; SONG, J.; DEMELER, J. Resistance as a tool for discovering and understading targets in parasite neuromusculature. *Parasitol*, v. 131, p. S179-S190, 2005.

SANTIAGO, E. DE F.; DE OLIVEIRA, S. A.; DE OLIVEIRA FILHO, G. B.; MOREIRA, D. R.; GOMES, P. A.; DA SILVA, A. L.; DE BARROS, A. F.; DA SILVA, A. C.; DOS SANTOS, T. A.; PEREIRA, V. R.; GONÇALVES, G. G.; BRAYNER, F. A.; ALVES, L. C.; WANDERLEY, A. G.; LEITE, A. C. Evaluation of the anti-*Schistosoma mansoni* activity of thiosemicarbazones and thiazoles. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 58, n. 1, p. 352-363, 2014.

SAYED, A. A.; SIMEONOV, A.; THOMAS, C. J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C. P.; WILLIAMS, D. L. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. *Nature Medicine*, v. 14, p. 407-412, 2008.

SETHY, S. P.; MEHER, C. P.; BISWAL, S.; SAHOO, U.; PATRO, S. K. The role of bioisosterism in molecular modification and drug design: a review. *AJPS*, v. 3, n.1, p. 61-87, 2013.

SILVA, A. C. A. Novas imidazolidinas potencialmente esquistossomicidas: Bioatividade de 2-tioxo-imidazolidin-4-onas frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (CEPA BH). 162 p. Dissertação. (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2004.

SILVA, L. C.; CHIEFFI, P. P.; CARRILHO, F. J.; Schistosomiasis mansoni – Clinical Features; *Gastroenterol Hepatol*, v. 28, n. 1, p. 30-92, 2005.

SILVA, A. C. A.; NEVES, J. K.; IRMÃO, J. I.; COSTA, V. M.; SOUZA, V. M.; DE MEDEIROS, P. L.; DA SILVA, E. C.; DE LIMA, M. DO C.; PITTA, I. DA R.; ALBUQUERQUE, M. C.; GALDINO, S. L. Study of the Activity of 3-benzyl-5-(4-chloro-arylazo)-4-thioxo-imidazolidin-2-one against Schistosomiasis Mansoni in mice. *Scien Worl J*, v. 2012, p. 520-524, 2012.

SILVA, A. L.; OLIVEIRA, S. A.; OLIVEIRA, J. F.; SANTIAGO, E. F.; ALMEIDA JÚNIOR, A. S. A.; JACOBI, I. T. T.; PEIXOTO, C. A.; ROCHA, V. P. C.; SOARES, M. B. P.; PITTA, I. R.; LIMA, M. C. A. Tegumental Changes in Adult *Schistosoma mansoni* Induced by a New Imidazolidinic Derivative. *British J Pharm Res*, v. 4, n. 16, p. 1988-2005, 2014.

SILVA, R. R.; PEREIRA, M. C.; MELO RÊGO, M. J.; DOMINGUES HATZLHOFFER, B. L.; DA SILVA, A. A.; BEZERRA, M. A. C.; PITTA, I. R.; DA PITTA, M. G. R. Evaluation of Th17 related cytokines associated with clinical and laboratorial parameters in sickle cell anemia patients with leg ulcers. *Cytokine*, v. 65, n. 2, p. 143-147, 2014.

SILVA, M. P. N.; OLIVEIRA, G. L. S.; CARVALHO, R. B. F.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; PINTO, P. L. S.; MORAES, J. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. *Molecules*, v. 19, p. 3793-3803, 2014.

SILVA, A. L. Avaliação da atividade esquistossomicida de compostos heterociclos pentagonais. 129 p. Tese. (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2014.

SIMONE, C. A.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.; PEREIRA, M. A.; LUU-DUC, C.; PITTA, I. R.; GALDINO, S. L.; AMORIM, E. L. C. 3-(4-Bromobenzyl)-5-(4-fluorobenzylidene)-imidazolidine-2,4-dione. *Acta Crystallog*, p. 2620-2621, 1995.

STANLEY, R. G.; JACKSON, C. L.; GRIFFITHS, K.; DOENHOFF, M. J. Effects of *Schistosoma mansoni* worms and eggs on circulating cholesterol and liver lipids in mice, *Atherosclerosis*, v. 207, n. 1, p. 131-138, 2009.

STEINMANN, P.; KEISER, J.; BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *Lancet Infect Dis*, v. 6, n. 7, p. 411-425, 2006.

STELMA, F. F.; SALL, S.; DAFF, B. Oxamniquine cures *Schistosoma mansoni* infection in a focus in which cure rates with praziquantel are unusually low. *J Infect Dis*, v. 176, p. 304-307, 1997.

TAN, F.; ANG, K. P.; FONG, Y. F. (Z)- and (E)-5-arylmethylenehydantoins: spectroscopic properties and configuration assignment *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions II*, v. 12, p. 1941-1944, 1986.

TALLIMA, H.; RIDI, R. Praziquantel binds *Schistosoma mansoni* adult worm actin. *Int J Antimicrob Agents*, v. 29, p. 570-575, 2007.

TAMAN, A.; RIBEIRO, P. Glutamate-mediated signaling in *Schistosoma mansoni*: A novel glutamate receptor is expressed in neurons and the female reproductive tract. *Mol Biochem Parasitol*, v. 176, p. 42-50, 2011.

TELES, H. M. S.; CARVALHO, O. S. Implicações da biologia de *Biomphalaria* no controle da esquistossomose. In: CARVALHO, O. S. et al. *Schistosoma mansoni* & esquistossomose: uma visão multidisciplinar, ed. Fiocruz, p. 461-478, 2008.

THIBAUT, J. P. B.; MONTEIRO, L. M.; LEITE, L. C. C.; MENEZES, C. M. S.; LIMA, L. M.; NOEL, F. The effects of 3-methylclonazepam on *Schistosoma mansoni* musculature are not mediated by benzodiazepine receptors. *Eur J Pharmacol*, v. 606, p. 9-16, 2009.

THOMAS, G. Medicinal chemistry: an introduction. Editora Guanabara Koogan; 2003.

VENNERVALD, B. J.; BOOTH, M.; BUTTERWORTH, A. E.; KARIUKI, H. C.; KADZO, H.; IRERI, E.; AMAGANGA, C.; KIMANI, G.; KENTY, L.; MWATHA, J.; OUMA, J. H.; DUNNE, D. W. Regression of hepatosplenomegaly in Kenyan school-aged children after praziquantel treatment and three years of greatly reduced exposure to *Schistosoma mansoni*. Trans R Soc Trop Med Hyg, v. 99, p. 150-160, 2005.

VIMIEIRO, A. C.; ARAUJO, N.; KATZ, N.; KUSEL, J. R.; COELHO, P. M. Schistogram changes after administration of antischistosomal drugs in mice at the early phase of *Schistosoma mansoni* infection. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 108, p. 881-886, 2013.

WASILEWSKI, M. M.; LIMB, K. C.; PHILLIPS, J.; MCKERROW, J. H. Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation in vitro and decrease worm burden and egg production *in vivo*. Mol Biochem Parasitol, v. 81, p. 179-189, 1996.

WATSON, M. B. S.; Praziquantel, J Exotic Pet Med, v. 18, p. 229-231, 2009.

WERBEL, L. M.; ELSLAGER, E. F.; ISLIP, P. J.; CLOSIER, M. D. Antischistosomal effects of 5-(2,4,5-trichlorophenyl) hydantoin and related compounds. J Med Chem, v. 20, p. 1569-72, 1977.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Media centre – Schistosomiasis. Factsheet N°115 - Janeiro 2012. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html. Acessado no dia 15/03/2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Initiative for Vaccine Research (IVR). Parasitic Diseases. www.who.int/vaccine_research/diseases/soa_parasitic/en/index5.html. Acessado no dia 14/01/2013a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Media centre – Schistosomiasis. Factsheet N°115 - Março 2013b. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html. Acessado no dia 15/03/2013b.

YANG, P.; YANG, Q.; QIAN, X.; TONG, L.; LI, X. Isoquino[4,5-bc]acridines: Design, synthesis and evaluation of DNA binding, anti-tumor and DNA photo-damaging ability. J Photochem Photobiol B: Biology, v. 84, p. 221-226, 2006.

XIAO, S. H.; CATTO, B. A.; WEBSTER, L. T. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* *in vitro* and *in vivo*. J Infect Dis, v. 151, p. 1130-1137, 1985.

XIAO, S. H.; SHEN, B. G.; CHOLLET, J.; UTZINGER, J.; TANNER, M. Tegumental alterations in juvenile *Schistosoma haematobium* harboured in hamsters following artemether treatment. Parasitol Int, v. 50, p. 175-183, 2001.

XIAO, S. H.; SHEN, B. G.; UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; TANNER, M. Ultrastructural alterations in adult *Schistosoma mansoni* caused by artemether. Mem Inst Oswaldo Cruz, v. 97, p. 717-724, 2002.

XIONG, J. Essential Bioinformatics. New York: United States of America by Cambridge University Press, p. 339, 2006.

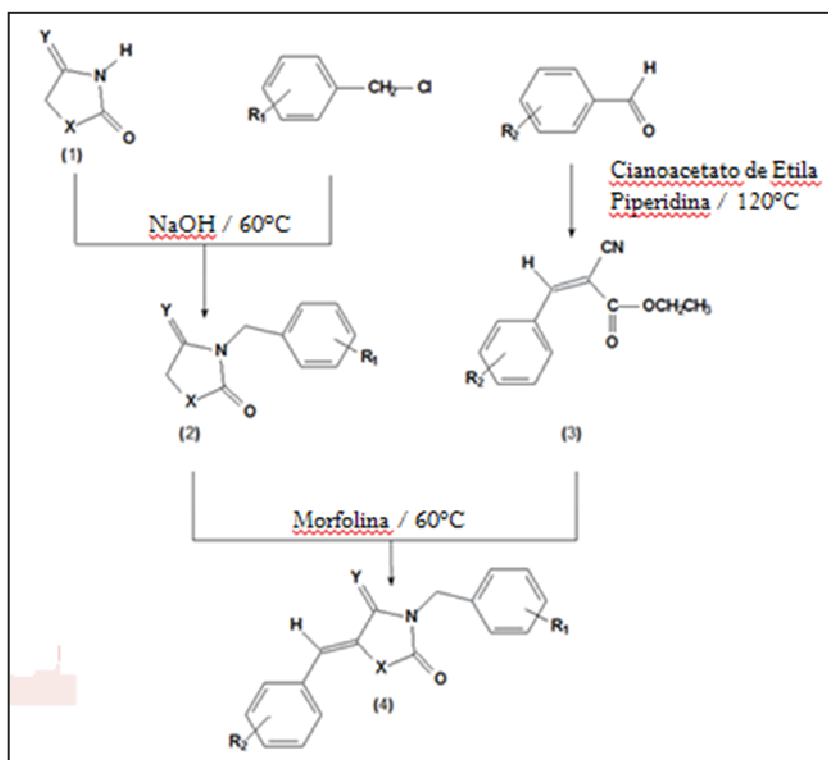
ANEXOS

**ANEXO 1 – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DOS
DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS**

1. Material

1.1 Reagentes e Solventes: Os seguintes reagentes e solventes foram utilizados para obtenção dos compostos: aldeídos aromáticos substituídos (3-indolcarboxaldeído, 5-bromo-indolcarboxaldeído, benzaldeído, 5-bromo-2-metóxi-benzaldeído, 2,4,6-trimetóxi-benzaldeído, 4-etóxi-benzaldeído, 3-metóxi-benzaldeído, 2,4-dimetóxi-benzaldeído), haletos de benzila substituídos (cloreto de 2-cloro-6-flúor-benzil), trietilamina, morfolina, Reagente de Lawesson, 1,4-dioxano, etanol absoluto, metanol, hidróxido de sódio. Estes reagentes e solventes utilizados na síntese dos compostos ou para suas análises pertencem às marcas Sigma-Aldrich, Acros, Merck, Vetec ou Quimis e foram utilizados sem purificação. Para a purificação dos produtos, quando necessário, foi realizada a cromatografia em coluna sob pressão, utilizando sílica gel 60 Merck (230-400 Mesh) como adsorvente. A seguir encontra-se ilustrado o diagrama de obtenção das imidazolidinas 3,5-dissubstituídas (Figura 11).

Figura 11 – Diagrama de síntese dos derivados imidazolidínicos obtidos.



1.3 Resultados da parte química: A seguir encontram-se as tabelas contendo dados físico-químicos, análise espectroscópica de RMN¹H e infravermelho.

Tabela 1 – Dados Físico-químicos dos derivados tioxo-imidazolidínicos obtidos.

Derivados	Rendimento	Rf	Faixa de Fusão	Massa Molar
LPSF/PTS2	40%	0,56 (<i>n</i> -Hex/Act, 1:1)	260°C	429.94
LPSF/PTS4	59%	0,6 (<i>n</i> -Hex/Act, 7:3)	264°C	452.93
LPSF/PTS10	69%	0,55 (<i>n</i> -Hex/Act, 6:4)	269°C	389.88
LPSF/PTS18	55,1%	0.4 (<i>n</i> -Hex/Act, 8:2)	211°C	392.81
LPSF/PTS19	65,4%	0,4 (<i>n</i> -Hex/Act, 7,5:2,5)	200°C	392.81
LPSF/PTS23	46,1%	0,4 (<i>n</i> -Hex/Act, 6:4)	152°C	436.89

Tabela 2 – Dados espectroscópicos referentes às análises de RMN ^1H (300 MHz) dos derivados PTS, utilizando-se DMSO- d_6 como solvente.

Derivados	N-H (s, 1dH)	CH_2 (s, 2H)	$=\text{CH}$ (s, 1H)	Benzílicos	Benzilidênico	Substituintes
LPSF/PTS2	11.044	5.155	6.927	7.155-7.201 (m, 1H) 7.295-7.391 (m, 2H)	6.58 (d, 2H, $J = 8.69$ Hz) 7.582 (d, 2H, $J = 8.69$ Hz)	1.578 -1.604 (m, 10H)
LPSF/PTS4	11.205	5.165 5.175	6.950	7.155-7.221 (m, 1H) 7.296-7.395 (m, 2H)	7.073 (d, 2H, $J = 8.69$ Hz) 7.674 (d, 2H, $J = 8.69$ Hz)	7.403-7.482 (m, 5H, benziloxi)
LPSF/PTS10	11.008	5.157	6.954	7.153-7.199 (m, 1H) 7.295-7.391 (m, 2H)	6.730 (d, 2H, $J = 9.19$ Hz) 7.580 (d, 2H, $J = 8.79$ Hz)	3.004 (s, 6H, CH_3)
LPSF/PTS18	11.603	5.186	6.980	7.183-7.227 (m, 1H) 7.316-7.417 (m, 2H)	7.913 (d, 2H, $J = 8.39$ Hz) 8.224 (d, 2H, $J = 8.79$ Hz)	X
LPSF/PTS19	11.578	5.184	7.015	7.180-7.227 (m, 1H) 7.315-7.416 (m, 2H)	7.695 (t, 1H, $J = 7.99$ Hz e $J = 7.59$ Hz) 8.063 (d, 1H, $J = 7.19$ Hz) 8.184 (d, 1H, $J = 7.99$ Hz) 8.424 (s, 1H)	X
LPSF/PTS23	10.115	5.132	6.984	7.157-7.223 (m, 1H) 7.297-7.385 (m, 2H)	6.261 (s, 2H)	3.8 (s, 6H, OCH_3), 3.84 (s, 3H, OCH_3)

Tabela 3 – Dados espectroscópicos referentes às análises de IV dos derivados tioxo-imidazolidínicos.

Derivados	N-H	C=O	C=C	C=S
LPSF/PTS2	2922.02 cm ⁻¹	1729.45 cm ⁻¹	1593.43 cm ⁻¹	
LPSF/PTS4	3215.63 cm ⁻¹	1736.29 cm ⁻¹	1595.86 cm ⁻¹	1511.31 cm ⁻¹
LPSF/PTS10		1725.22 cm ⁻¹	1588.95 cm ⁻¹	1531.52 cm ⁻¹
LPSF/PTS18		1730.52		
LPSF/PTS19	3288.16 cm ⁻¹	1728.19 cm ⁻¹	1651.32 cm ⁻¹	1521.60 cm ⁻¹
LPSF/PTS23	3413.59 cm ⁻¹	1747.92 cm ⁻¹	1598.88 cm ⁻¹	

ANEXO 2 – PARECER DO CEP/CCS/UFPE



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Comitê de Ética em Pesquisa
Av. da Engenharia, s/n - 1º andar - Sala 4 - Cidade Universitária
50.740-600 Recife - PE, Tel/fax: 81. 2126.8588 - cepccs@ufpe.br

Ofício nº. 054/2013 - CEP/CCS/UFPE

Recife, 26 de fevereiro de 2013.

A
Profa. Maira Galdino da Rocha Pitta
Departamento de Bioquímica - CCB/UFPE

Registro do SISNEP FR - 390343
CAAE - 0478.0.172.105-10
Registro CEP/CCS/UFPE Nº 483/10
Título: Estudo da via Th17 em pacientes portadores de anemia falciforme com úlcera
maleolar: Descoberta de novos alvos terapêuticos.

Senhor (a) Pesquisador (a):

O Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE) recebeu em 25/02/2013 o relatório final do protocolo em epígrafe e considera que o mesmo foi devidamente aprovado por este Comitê nesta data.

Atenciosamente

Geraldo Bosco Lindoso Coutinho
Prof. Geraldo Bosco Lindoso Coutinho
Coordenador do CEP/CCS/UFPE

Vanila Pinheiro Ramos
Vanila Pinheiro Ramos
Vice-coordenadora do Comitê de Ética
em Pesquisa CCS/UFPE

CÓPIA

	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA Rua. Joaquim Nabuco, 171- Graças Recife-PE. CEP: 52011.900 Tel.: 81- 3182-4771 Fax: 81- 3182-4660 E-mail: cep.hemope@gmail.com	 Governo do Estado de PE Secretaria de Saúde do Estado de PE
---	--	--

1 - DADOS SOBRE O PROJETO**PARECER PENDENTE : N°. 057/2010**

Título do Projeto: Estudo da via Th17 em pacientes portadores de anemia falciforme com úlcera maleolar: descoberta de novos alvos terapêuticos.

Instituição Solicitante: Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Pesquisadora: Maíra Galdino da Rocha Pitta

Identidade: 6304255 **CPF:** 039.972.064-22 **Telefone:** 81 – 9671-7788

Endereço: Av. Boa Viagem, 5554/202 – Boa Viagem- Recife – PE – CEP: 51030-000

Local de Desenvolvimento do Projeto: Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Departamento de Antibióticos da UFPE e Hospital de Hematologia da Fundação Hemope.

Co-Orientador: Marcos André Cavalcanti Bezerra

Orientado: Rafael Ramos da Silva

Finalidade: Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (PPGIT).

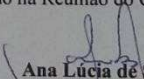
2 - COMENTÁRIOS DOS RELATORES:

Objetivo Geral: Investigar o papel de via Th17 em pacientes portadores de anemia falciforme (HbSS) com úlcera maleolar e em pacientes HbSS se úlcera maleolar que são atendidos na Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco- HEMOPE

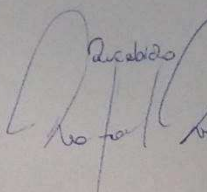
3 - PARECER DO RELATOR: De acordo com a Resolução CNS 196/96 e complementares julgo o projeto protocolo de pesquisa **PENDENTE** nos itens discriminados a seguir: **Metodologia:** a) Grupo de voluntários; **parâmetro de escolha;** onde será **captado;** de **que forma;** por quem; onde coletará o sangue. b) Identificar quem é o responsável pela coleta de sangue. c) Padronizar volume de coleta de sangue. **TCLE:** Ausência do nome do mestrando e do CEP-HEMOPE. **Curriculo:** Ausência do currículo do Mestrando e do Co-orientador e **Cronograma:** Incluir CEP-HEMOPE.

Obs.: Prazo para entrega das pendências 60 dias após a data do recebimento.

Homologado na Reunião do CEP de 15/12/2010


Ana Lucia de Sena
Coordenadora

Comitê de Ética em Pesquisa -HEMOPE


Rafael Ramos da Silva

**ANEXO 3 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E
ESCLARECIDO**

Anexo I

Termo de consentimento livre esclarecido para cidadãos alfabetizados

« Estudo da via Th17 em pacientes portadores de anemia falciforme com úlcera maleolar: descoberta de novos alvos terapêuticos »

Nós o convidamos a participar de uma pesquisa que visa estudar o que está alterado no organismo de pacientes portadores de anemia falciforme com úlcera maleolar. Como pesquisadores responsáveis deste estudo, nosso objetivo é melhorar o conhecimento sobre a doença permitindo o desenvolvimento de novos tratamentos para os pacientes portadores desta doença. Nesta pesquisa só será realizado testes com as células presentes no seu sangue, após este ter sido coletado por profissionais competentes.

É importante ressaltar que:

1. Sua participação é inteiramente voluntária;
2. Você terá ressarcimento de despesas, como transporte ou alimentação, durante a participação na pesquisa;
3. Você pode deixar de participar do estudo a qualquer momento que quiser;
4. Nós solicitaremos novamente sua aprovação (verbal) no momento de cada coleta;
5. Suas informações nunca serão divulgadas, ou seja, permanecerão confidenciais.

A anemia falciforme é uma doença herdada causada por uma mutação de ponto no gene da globina β . Essa mutação resulta em uma hemoglobina anormal. Esta doença aumentada a ocorrência de complicações como artralgia (dores musculares), crises dolorosas, dores abdominais, necrose asséptica de cabeça de fêmur, lesões de retina, acidente vascular cerebral e o desenvolvimento de úlceras maleolares. No estado de Pernambuco, a anemia falciforme afeta 1/1.400 nascidos vivos. O Hospital de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco tem cadastrado atualmente 1.500 pacientes com doença falciforme, destes estima-se que 10% desenvolvem úlcera maleolar.

Em 2005, foi descoberta uma nova via dos linfócitos T, as Th17, envolvidas no aumento da gravidade dos processos inflamatórios crônicos. O papel destas células na anemia falciforme ainda não foi esclarecido. Desta forma, é necessário a realização deste projeto de pesquisa para identificar o envolvimento dessa via tanto em pacientes com anemia falciforme com úlceras maleolares quanto sem úlceras.

Nós solicitamos a sua colaboração e participação neste estudo porque você é portador de anemia falciforme com ou sem úlcera maleolar ou por você ser um voluntário não portador desta doença. Este estudo inclui a participação de 80 indivíduos.

Para este estudo, precisamos coletar algumas células de sangue. A coleta de sangue é feita no braço e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (10-15 ml). A coleta de sangue pode ser desconfortável e o braço pode ficar um pouco dolorido e apresentar hematoma que é uma área arroxeadada no local da coleta. Antes de iniciar a coleta, nós limparemos o seu braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados e competentes e orientados para reduzir os riscos.

Caso um novo alvo para fármaco seja descoberto, o desenvolvimento de um novo fármaco será priorizado. Desta forma, os pacientes portadores de anemia falciforme poderão ser beneficiados.

Os resultados deste estudo serão apresentados em congressos, conferências ou em revistas médicas, mas não aparecerá seu nome. Suas informações nunca serão divulgadas, permanecerão confidenciais. Os dados da pesquisa serão arquivados com o pesquisador responsável do projeto.

Você tem alguma pergunta sobre a sua participação neste estudo?

Se você tiver alguma pergunta mais tarde, poderá conversar com um dos membros da nossa equipe, podendo contatar:

Profa. Dr. Maira Galdino da Rocha Pitta, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife - PE. E-mail: mgrpitta@gmail.com. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8346

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti Bezerra Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife - PE. E-mail: macbezerra@bol.com.br. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8535.

Assim como, o coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa - CEP/CCS, o Professor **Dr. Geraldo Bosco Lindoso Couto**, do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego S/N - Cidade Universitária, CEP: 50.670-901 Recife - PE. Telefone/Fax: 55 (81) 2126-8588.

Você ficará com uma cópia deste documento.

Nome do responsável pela coleta de sangue: _____

Se você aceitar participar deste estudo, por favor, preencha o formulário abaixo.

Nome: _____

RG: _____ Data: _____

Endereço: _____

Assinatura: _____

Testemunha 1: _____

RG: _____ Data: _____

Testemunha 2: _____

RG: _____ Data: _____

Assinatura dos envolvidos diretamente no Projeto:

Profa. Dr. Maira Galdino da Rocha Pitta
Bezerra

Prof. Dr. Marcos André Cavalcanti

Pesquisador Responsável

Dr. Aderson da Silva Araújo

ANEXO 4 – PARECER DO CEUA/FIOCRUZ/PE



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

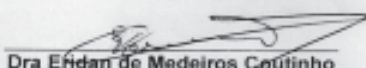
Certificado de Aprovação

Certificamos que o Projeto intitulado Ação de produtos naturais e do Praziquantel em Schistosoma mansoni e caracterização da resposta celular de Biomphalaria glabrata e Biomphalaria straminea. Protocolado sob o Nº 06/2010, coordenado pelo (a) pesquisador (a) Luiz Carlos Alves de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-CPqAM) em reunião 28/07/2011. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até dezembro de 2015

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
CAMUNDONGO MUS	
MUSCULUS SWISS WEBSTER	230
IDADE 28 DIAS	
PESO 30 A 35g.	TOTAL 230

We certify that the project entitled Ação de produtos naturais e do Praziquantel em Schistosoma mansoni e caracterização da resposta celular de Biomphalaria glabrata e Biomphalaria straminea (CEUA Protocol Nº 06/2010), coordinated by Luiz Carlos Alves is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz on July 28, 2011. In the present version this project is licensed and valid until december, 2015

Recife (PE, Brazil) september 21, 2011.


Dra. Eridani de Medeiros Coutinho

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – FIOCRUZ