



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ANTÔNIO SÉRGIO ALVES DE ALMEIDA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA E ANÁLISE
ULTRAESTRUTURAL DE DERIVADOS INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS**

RECIFE

2017

ANTÔNIO SÉRGIO ALVES DE ALMEIDA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA E ANÁLISE
ULTRAESTRUTURAL DE DERIVADOS INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

ORIENTADORA:

Prof^a. Dr^a. Maria do Carmo Alves de Lima

COORIENTADORES:

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves

Prof^a. Dr^a. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

RECIFE

2017

Catálogo na fonte:
bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

A447a Almeida Júnior, Antônio Sérgio Alves de.
Avaliação da atividade esquistossomocida e análise ultraestrutural de derivados indol-tiossemicarbazonas / Antonio Sérgio Alves de Almeida Júnior. – Recife: o autor, 2018.
86 f.; il; 30 cm.

Orientadora: Maria do Carmo Alves de Lima.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em ciências farmacêuticas.
Inclui referências, figuras e tabelas.

1. Esquistossomose. 2. Tiossemicarbazonas. 3. Indol. 4. Naftil. I. Lima, Maria do Carmo Alves de (orientadora). II. Título.

615.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 042)

ANTÔNIO SÉRGIO ALVES DE ALMEIDA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMOICIDA E ANÁLISE
ULTRAESTRUTURAL DE DERIVADOS INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Data: 30 de Novembro de 2017

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Maria do Carmo Alves de Lima (Presidente e Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Jamerson Ferreira de Oliveira (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Ricardo Olímpio de Moura (Examinador Interno)
Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Prof. Dr. André de Lima Aires (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dr. Tiago Bento de Oliveira (Examinador Externo)
Instituto Federal de Alagoas - IFAL

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus pais e a minha vovó Maria Aldenora.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela minha existência e por tudo que ele tem feito em minha vida.

À Universidade Federal de Pernambuco que desde a graduação fui recebido e acolhido por toda a sua estrutura e profissionais que me fizeram enriquecer intelectualmente e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos que o compõem pela competência e dedicação aos alunos.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pelo suporte financeiro da bolsa de doutorado.

Ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM – FIOCRUZ), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA – UFPE), Departamento de Antibióticos (CCB – UFPE) e a todos os funcionários que os fazem, pela sua estrutura e pelo suporte fornecido para a produção deste trabalho.

À minha orientadora (FINALMENTE), Professora Dr^a Maria do Carmo Alves de Lima, por ter acreditado e confiado em mim desde o 1^o dia em que ela me avistou na sala de aula e me chamou para conhecer o seu Laboratório e desde então não saí mais de lá. Obrigado pela orientação, estímulo, carinho, dedicação, paciência e por todos os momentos de aprendizado desde a bancada até a sala de aula.

Aos Profs. Drs. Luiz Carlos Alves e Fábio Brayner pela colaboração adquirida desde o mestrado, companheirismo, pelas palavras de incentivo, pelos conhecimentos construídos, pela amizade e pelo profissionalismo que levarei como exemplo para a minha vida acadêmica e científica.

À Prof Mônica Albuquerque e ao Prof. André Aires pela colaboração, orientação, ensinamentos e pela recepção no laboratório.

Aos Profs. e amigos Jamerson Ferreira e Anekécia Lauro pelos anos de convivência, pela amizade preciosa, pela parceria de sempre, por tanta paciência, pelas palavras de incentivo, pelo carinho e pela grande importância na colaboração deste trabalho. Guardo com muito carinho todas as lembranças de tudo que vivemos juntos, muito obrigado.

Aos amigos e companheiros Rubens Rocha, Naironberg Portela e Karla Ribeiro pela grande parceria em todos os momentos vivenciados pelos anos de doutorado e no LBCM-FIOCRUZ, pelos conhecimentos construídos, pela paciência na ansia de obtermos os melhores protocolos e resultados, pela grande amizade construída pela grande importância na colaboração deste trabalho.

Aos companheiros e amigos que fazem ou fizeram parte do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LqIT/UFPE) Miguel Segundo, Prof. Ricardo Olímpio, Prof. Tiago Bento, Elizabeth Lafayette, Sybele Lacerda, Nayara Leite e aos demais colegas do LqIT pela amizade, por toda construção de conhecimento, confiabilidade, perseverança, fé, alegrias, companheirismo e por toda assistência dada para que eu pudesse realizar este trabalho.

Aos companheiros que fazem parte do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM – IAM - FIOCRUZ) Amanda Vasconcelos (Falsinha), Gabriel Gazzoni, Elverson Melo, Fernanda Lima, Catarina Fernandes, Everton Morais, Jorge Belém, Camila Moraes e “Seu” Marcos, pelos momentos de alegria e conversa, pelos conhecimentos contruídos, amizade, pela assistência dada para a realização des trabalho e pelas palavras de incentivo.

À Luana Mariz e Risoleta Nogueira pela grande amizade, aventuras, risadas, tristezas, esforços, fé, companheirismo, construção de conhecimento, confiabilidade; obrigado por tudo meninas!

À Fabiana Gomes e Lívia Bandeira que foram excepcionais nessa fase final de doutorado, tenho muito que agradecer pela força, pela ajuda na revisão dos textos e nos últimos experimentos.

Aos meus grandes e queridos amigos do peito Andreza Tavares, João Paulo, Thayane Kalyne, Paulecy Nunes, Michele Brito, Wesley Leal pela paciência, amizade, amor, abraços, ajuda, torcida, alegria, fé, por me aguentarem nos momentos difíceis e pela compreensão nas minhas ausências.

Ao meu companheiro Abner Maciel pela paciência, companheirismo e pelas palavras de incentivo em todos os momentos.

À minha família em especial a minha vovó Maria Aldenora, aos meus pais e minha irmã (Josefa Almeida, Antônio Sérgio e Larissa Almeida) pela torcida, por acreditarem no meu potencial e contribuindo de todas as formas para que um dia pudesse alcançar meu objetivo.

A todos os amigos não citados e aos que fizeram parte desse trabalho, diretamente e indiretamente e que presenciam a minha caminhada, o meu muito obrigado.

RESUMO

A esquistossomose é reconhecida pela OMS, como um grave problema de saúde pública, devido ao seu potencial de morbidade. O controle dessa parasitose é um desafio para os países endêmicos, pois requer custos e tempo. Atualmente, o PZQ é o fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose, no entanto, problemas de eficácia nas formas juvenis e de cepas resistentes são relatadas pela literatura. Assim, há a necessidade de desenvolver novos medicamentos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento da esquistossomose. A Química medicinal apresenta várias estratégias de planejamento de fármacos (hibridação molecular, bioisosterismo, química computacional), no entanto, estratégias de reposicionamento de fármacos para o tratamento da esquistossomose estão sendo verificadas em vários estudos. Outras alternativas terapêuticas também estão presentes como, as tiosemicarbazonas, os anéis indol e tiazolidinona, ambos apresentam derivados biologicamente ativos conhecidos na literatura, inclusive esquistossomicida. Neste trabalho foi avaliado derivados indol-tiosemicarbazonas para a atividade esquistossomicida. Foram utilizados os derivados LqIT/LT-50, LqIT/LT-51, LqIT/LT-53, LqIT/LT-54, LqIT/LT-55, LqIT/LT-56, LqIT/LT-57, LqIT/LT-58 e LqIT/LT-59 obtidos por uma rota sintética de via plena convergente utilizando mecanismos reacionais de adição, condensação e ciclização. Os derivados indol-tiosemicarbazonas demonstraram um CC_{50} entre 6.2 μ M e 30.53 μ M apresentando uma citotoxicidade relativamente alta quando comparada ao PZQ. Na atividade *in vitro* de vermes adultos para *S. mansoni*, o derivado LqIT/LT-51 apresentou 100% de mortalidade em 24 horas de observação na concentração de 200 μ M e para vermes jovens, o LqIT/LT-51 apresentou 100% de mortalidade em 48 horas. Na avaliação estrutural de vermes adultos e jovens, o derivado LqIT/LT-51 foi capaz de causar extensas modificações tegumentares (desintegração de tegumento, formação de bolhas, inchaço e erosões) apontando um possível mecanismo de ação do LqIT/LT-51. O mesmo derivado foi capaz de fragmentar o DNA genômico de *S. mansoni* de vermes adultos visualizado por meio de gel de agarose pela técnica de eletroforese, caracterizando por um processo de apoptose, mostrando como possível alvo biológico, o DNA. Na avaliação da toxicidade aguda *in vivo*, o LqIT/LT-51 não se mostrou tóxico diante dos parâmetros analisados. Na avaliação da eficácia deste derivado utilizando camundongos infectados por *S. mansoni*, verificou-se que o derivado LqIT/LT-51 na dose de 50 μ mol/Kg apresentou uma eficácia de 66,6% na

redução de vermes adultos pós-tratamento. Além disso, o LqIT/LT-51 foi capaz de aumentar em 60,59% o número de ovos maduros e suprimiu em 96,67% os ovos imaturos pós-tratamento, evidenciando a ação do LqIT/LT-51 sobre a oviposição dos vermes de *S. mansoni*. Estes resultados mostraram que o núcleo indol, a tiossemicarbazona e o grupo naftil, pertencentes ao derivado LqIT/LT-51 são promissores *scaffolds* para o desenvolvimento de novos fármacos para esquistossomose.

Palavras-chave: Esquistossomose. Tiossemicarbazonas. Indol. Naftil.

ABSTRACT

Neglected tropical diseases are a group of diseases caused by infectious and parasitic agents such as viruses, bacteria, protozoa and helminths that affect mainly a poor population of the world and live without basic sanitation, these diseases are grouped in the countries of the tropical and subtropical regions of the Globe. Schistosomiasis is recognized by the WHO as a serious public health problem because of its potential for morbidity. The control of this parasite is a challenge for the endemic countries, since we require costs and time. Today, PZQ is the drug of choice for the treatment of schistosomiasis, however, efficacy problems in juvenile forms and resistant strains are reported in the literature. Thus, there is a need to develop new drugs that are more effective and less toxic for the treatment of schistosomiasis. Medical chemistry presents the strategy of drug planning (molecular hybridization, bioisosterism, computational chemistry); however, the clinical drug repositioning structure for the treatment of schistosomiasis is being verified in several studies. Other therapeutic alternatives are also present, such as thiosemicarbazones, the indole and thiazolidinone rings, both published biologically active derivatives known in the literature, including schistosomicidal. In this study, indol-thiosemicarbazones were evaluated for schistosomicidal motivation. The derivatives (LqIT/LT-50, LqIT/LT-51, LqIT/LT-53, LqIT/LT-54, LqIT/LT-55, LqIT/LT-56, LqIT/LT-57, LqIT/LT-58 and LqIT/LT-59). The indole-thiosemicarbazones derivatives showed a CC_{50} between 6.2 μ M and 30.53 μ M. In the *in vitro* activity of adult worms for *S. mansoni*, the LqIT/LT-51 derivative presented 100% mortality in 24 hours of observation at the concentration of 200 μ M and for young worms, LqIT/LT-51 presented 100% mortality in 48 hours. In the structural evaluation of adult and young worms, the LqIT/LT-51 derivative is capable of causing extensive tegumentary changes (tegumentary disintegration, bubble formation, swelling and erosions) indicating a mechanism of action of LqIT/LT-51. The same derivative was able to fragment *S. mansoni* genomic DNA from adult worms through electrophoresis, characterized by a process of apoptosis, showing as a possible biological target, DNA. In the assessment of acute toxicity *in vivo*, LqIT/LT-51 did not show forward of the parameters analyzed. In the evaluation of the efficacy of this derivative, the use of *S. mansoni* infected mice was used, the LqIT/LT-51 derivative at a dose of 50 μ mol/kg was found to have a 66.6% efficacy in reducing post partum adult worms treatment. In addition, LqIT/LT-51 was able to increase the number of mature eggs

by 60.59% and suppressed immature eggs after treatment by 96.67%, evidencing an action of LqIT/LT-51 on oviposition of worms of *S. mansoni*. These results showed that the indole nucleus, thiosemicarbazone and naphthyl group belonging to the LqIT/LT-51 derivative are promising scaffolds for the development of new drugs for schistosomiasis.

Keywords: Schistosomiasis. Thiosemicarbazones. Indole. Naphthyl.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CC ₅₀	Concentração que causar a perda de viabilidade em 50% das células
ctDNA	Ácido desoxirribonucleico de timo bovino
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNDi	Iniciativa de Drogas para Doenças Negligenciadas
GPIT	Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica
HI	Forma intestinal
HMEs	Enzimas modificadoras de histonas
HS	Hepatointestinal
HTS	<i>High Throughput Screening</i> – Triagem de alto rendimento
IC ₅₀	Concentração capaz de inibir 50% do crescimento
IR	Infra-Vermelho
IS	Índice de seletividade
LBDD	Planejamento de fármacos baseado no ligante
LqIT	Laboratório de Química e Inovação Terapêutica
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
OMS/WHO	Organização Mundial De Saúde
PBS	Phosphate buffered saline (Tampão fosfato-salina)
PZQ	Praziquantel
QSAR	<i>Quantitative Structure-Activity relationship</i> - Estudo de relação estrutura-atividade quantitativa
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SBDD	Planejamento de fármacos baseado na estrutura do receptor
SFB	Soro Fetal Bovino
TBE	Tris/Borato/EDTA
UV-Vis	Ultravioleta-Visível

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do PZQ	23
Figura 2 - Esqueleto da tiossemicarbazona.....	30
Figura 3 - Esqueleto do Indol.....	31
Figura 4 - Esqueleto da tiazolidinona.....	32
Figura 5 - Esqueleto estrutural do derivado tiofeno-tiossemicarbazona JF-3.....	44
Figura 6 - Derivados indol-tiossemicarbazonas. A. LqIT/LT-51, B. LqIT/LT-55, C. LqIT/LT-58.....	46
Figura 7 - Derivados indol-tiossemicarbazonas. A. LqIT/LT-50 e B. LqIT/LT-51.....	47
Figura 8 - Derivado indol-tiossemicarbazonas LqIT/LT-50.....	49
Figura 9 - Derivados indol-tiossemicarbazonas. A. LqIT/LT-54 e B. LqIT/LT-55.....	49
Figura 10 - Derivados indol-tiossemicarbazonas. A. LqIT/LT-58 e B. LqIT/LT-59.....	50
Figura 11 - Derivados indol-tiossemicarbazonas. A. LqIT/LT-53, B. LqIT/LT-56 e C. LqIT/LT-57.....	50
Figura 12 - Ciclização do sistema NNS da tiossemicarbazona (A) no anel 4-tiazolidinona (B).....	51
Figura 13 - Estrutura química do composto LpQM-45 (2-(2-(2-(4-(4-metóxfenil) tiazol-2-il)hidrazono)etil)isoindol-1,3-diona).....	51
Figura 14 - Gráfico de viabilidade de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> tratados com o derivado LqIT/LT-51 após 24h determinado pelo ensaio de MTT em 550 nm (** p< 0.01) (* p< 0.01).....	54
Figura 15 - Estrutura química da β -Lapachona.....	54
Figura 16 - Estrutura química da Primaquina.....	56
Figura 17 - Gráfico de viabilidade de vermes jovens de <i>S. mansoni</i> tratados com o derivado LqIT/LT-51 após 24h determinado pelo ensaio de MTT em 550 nm (** p<0.001) (** p< 0.01).....	56
Figura 18 - Imagens de MEV de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> não submetidos a tratamento (meio RPMI + DMSO) após 24 horas de	

observação. A) Ventosas orais (OS) e ventrais (VS) de vermes fêmea. B-C) Fissuras paralelas (FI) e espinhos (S). D) Canal ginecofórico (CG) de vermes macho apresentando-se sem anormalidades. E) Tubérculos (TU) com espículos (S). F) Papilas sensoriais (SP). (F-G) Imagens de MEV de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* tratados com praziquantel (10 µM) após 24 horas de observação. F) Verme mostrando um corpo contorcido (seta). G) Danos graves no tegumento, com o aparecimento de bolhas estouradas (BU) com perda de espículos..... 59

Figura 19 - Imagens de MEV de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* submetidos a tratamento com o composto LqIT/LT-51 (200 µM) após 24 horas de observação. (A -C) Vermes fêmeas com extensiva desintegração do tegumento (DI), erosões (ER) e descamações (PL) pelo corpo. (D-F) Vermes machos com extensiva desintegração do tegumento (DI) e erosões (ER), com o aparecimento de bolhas (BU), aparecimento da camada muscular (ML), tecido subcutâneo (TS)..... 61

Figura 20 - Estrutura química da Mefloquina..... 62

Figura 21 - Imagens de MEV de vermes jovens de *Schistosoma mansoni* não submetidos a tratamento (meio RPMI + DMSO) após 24 horas de observação. A) Ventosa ventral (VS) e início do canal ginecofórico (CG). B) Espículas (SP). C) Espinhos (S). (D-E) Imagens de MEV de vermes jovens de *Schistosoma mansoni* tratados com praziquantel (10 µM) após 24 horas de observação. D) Contração do corpo (seta). E) Danos no tegumento, com o aparecimento de bolhas (BU) e rugas tegumentais (W). (F-H) Imagens de MEV de vermes jovens de *Schistosoma mansoni* submetidos a tratamento com o composto LqIT/LT-51 (200 µM) após 24 horas de observação. F) Extensa destruição no tegumento. G) Aparecimento de rugas tegumentares (W) e descamações pelo corpo (PL). H) Desintegração de parte do tegumento em alguns pontos (DI), fortes erosões (ER) e muitas descamação (PL)..... 63

Figura 22 - Formação da fragmentação do DNA de vermes adultos de *S. mansoni* através do gel de agarose. Pista 1: DNA Ladder, Pista 2: DNA de vermes adultos de *S. mansoni* não tratados (Controle negativo), Pista 3: DNA de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com o derivado indol-

tiossemicarbazona LqIT/LT-51 (200 μ M), Pista 4: Ciclofosfamida.....	65
Figura 23 - Estrutura química do composto 4-(naftalen-1-il)-1-(2,4-difluorobenzilideno)-tiossemicarbazida.....	66
Figura 24 - Estrutura química da isatin- β -tiossemicarbazona (IBT).....	66
Figura 25 - Estrutura química do alcalóide Harmalol.....	67
Figura 26 - Esqueleto dos derivados tiossemicarbazonas utilizados nos estudos de Almeida e colaboradores (2015).....	67
Figura 27 - Estrutura química do DNK ((-)-6,6'-dinitrohinokinina).....	70
Figura 28 - Efeitos do derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 e PZQ sobre os estádios de maturação dos ovos de <i>S. mansoni</i>	72
Figura 29 - Estrutura química do Clorambucil.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Medicamentos reutilizados com sucesso e reposicionamento de candidatos em ensaios clínicos para doenças tropicais negligenciadas.....	28
Tabela 2 - Medicamentos da clínica avaliados biologicamente para serem reposicionados ao tratamento da esquistossomose.....	29
Tabela 3 - Derivados indol-tiossemicarbazonas utilizados no estudo.....	34
Tabela 4 - Citotoxicidade e porcentagem da mortalidade de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> submetidos ao tratamento com os derivados indol-tiossemicarbazonas na concentração inicial de 200 µM.....	45
Tabela 5 - Valores de LogP para os derivados indol-tiossemicarbazonas da série LT.....	48
Tabela 6 - Scores da motilidade de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> expostos aos derivados indol-tiossemicarbazonas.....	52
Tabela 7 - Mortalidade de vermes jovens de <i>S. mansoni</i> submetidos ao tratamento com os derivados indol-tiossemicarbazonas na concentração inicial de 200 µM.....	55
Tabela 8 - Sinais de toxicidade aguda e mortalidade do derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 na dose de 2000 µmol/Kg.....	69
Tabela 9 - Eficácia do tratamento de camundongos infectados por <i>S. mansoni</i> e tratados com o derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 e PZQ.....	70
Tabela 10 - Efeito do derivado 3-indol-tiossemicabazona LqIT/LT-51 sobre os estádios de maturação dos ovos de <i>S. mansoni</i>	72

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1. OBJETIVOS.....	20
1.1.1. Objetivo geral.....	20
1.1.2 Objetivos específicos.....	20
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	21
2.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS.....	21
2.2 A QUIMIOTERAPIA DA ESQUISTOSSOMOSE.....	22
2.2.1 Praziquantel.....	22
2.3 QUÍMICA MEDICINAL E O PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS PARA A ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.....	24
2.3.1 Redirecionamento de fármacos.....	26
2.4 NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA A ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA.....	30
2.4.1 Tiossemicarbazonas.....	30
2.4.2 Compostos heterocíclicos.....	31
2.4.2.1 Indol.....	31
2.4.2.2 Tiazolidinona.....	32
3 METODOLOGIA.....	33
3.1 LOCAL.....	33
3.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA.....	33
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS – ESTUDO QUÍMICO.....	33
3.3.1 Derivados indol-tiossemicarbazonas do estudo.....	34
3.4 MATERIAIS E MÉTODOS – ESTUDO BIOLÓGICO.....	35

3.4.1 Citotoxicidade em células macrofágicas J774A.1.....	35
3.4.2 Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vitro</i>.....	36
3.4.2.1 Animais.....	36
3.4.2.2 Infecção por <i>Schistosoma mansoni</i>	36
3.4.2.3 Perfusão do sistema porta para recuperação de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	36
3.4.2.4 Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> frente aos derivados indol-tiossemicarbazonas.....	37
3.4.2.5 Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> de vermes jovens de <i>Schistosoma mansoni</i> frente aos derivados indol-tiossemicarbazonas.....	38
3.4.2.6 Ensaio de viabilidade dos parasitos.....	38
3.4.2.7 Ensaio de fragmentação do DNA.....	39
3.4.3 Avaliação da atividade esquistossomicida ultraestrutural.....	39
3.4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	39
3.4.4 Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vivo</i>.....	40
3.4.4.1 Ensaio de toxicidade aguda oral.....	40
3.4.4.2 Tratamento <i>in vivo</i> com o derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51.....	40
3.4.4.2.1 <i>Animais e grupo experimental</i>	40
3.4.4.2.2 <i>Avaliação de critérios parasitológicos</i>	41
3.4.4.2.3 <i>Determinação da efetividade do tratamento</i>	41
3.4.4.2.4 <i>Porcentagem de estádios de desenvolvimento do ovo (Oograma)</i>	42
3.4.5 Análise estatística.....	42
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
4.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS J774A.1 DOS DERIVADOS INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS.....	43
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VITRO</i>	44
4.2.1 Alteração da viabilidade dos vermes adultos e jovens <i>in vitro</i> frente aos derivados indol-tiossemicarbazonas.....	44
4.3 ULTRAESTRUTURA DE VERMES ADULTOS E JOVENS DE <i>S. mansoni</i>	57

4.3.1 Alteração do tegumento dos vermes adultos e jovens <i>in vitro</i> por microscopia eletrônica de varredura.....	57
4.4 CAPACIDADE DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE <i>S. mansoni</i> TRATADO COM O DERIVADO INDOL-TIOSSEMICARBAZONA LQIT/LT-51.....	64
4.4.1 Eletroforese.....	64
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>IN VIVO</i>.....	68
4.5.1 Toxicidade aguda do derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51	68
4.5.2 Determinação da efetividade do tratamento com o derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51.....	69
4.5.3 Oograma.....	71
5 CONCLUSÕES.....	74
6 PERSPECTIVAS.....	75
REFERÊNCIAS.....	76
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA – CEUA/FIOCRUZ	86

1 INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são responsáveis por afetar mais de um bilhão de pessoas em todo o mundo, principalmente aquelas encontradas nas regiões tropicais e subtropicais do globo (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 2010; WHO, 2017). Entre as DTNs, tem-se como exemplo diversas parasitoses, destacando-se aquelas causadas por helmintos, como a esquistossomose mansônica, causada pelo parasito *Schistosoma mansoni* (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 2010; WHO, 2017,).

A esquistossomose é a segunda doença de importância na saúde pública, com a incidência de 269 milhões de pessoas e com mais de 779 milhões de pessoas que residem em áreas endêmicas (regiões como na América Latina, Caribe África e Oriente Médio), causando 200 mil mortes por ano (WHO, 2017a). No Brasil, o número de casos de esquistossomose mansônica, entre 2010 e 2016, foi de 243.721, sendo a maioria desses casos na região Nordeste (216.802) (MS, 2017b).

Essa parasitose acomete principalmente o fígado, caracterizado pela presença de granulomas que são desencadeados pelos ovos no tecido, desenvolvimento de fibrose e hipertensão portal. Nesta evolução, a infecção se torna crônica, levando à morbidade e mortalidade dos infectados (LAMBERTUCCI *et al*, 2008; SOUZA *et al.*, 2011; CAFFREY, 2015).

O tratamento da esquistossomose é baseado na quimioterapia, sendo o praziquantel (PZQ) o fármaco de escolha no Brasil, o qual se destaca pela sua eficácia contra todas as espécies de *Schistosoma*. No entanto, devido ao seu uso exclusivo durante várias décadas, já foram relatadas evidências de casos que sinalizam possíveis resistências de cepas de *S. mansoni* (PICA-MATTOCCIA, L. & CIOLI, D, 2004; PICA-MATTOCCIA *et al.*, 2007; TALLIMA & RIDI, 2007) e a baixa eficácia nas formas juvenis do parasito (ABDI *et al.*, 2003; CAFFREY, 2015).

Sabendo de todos esses problemas relatados acerca do PZQ, e uma vez que não existe uma vacina totalmente segura e apropriada para uso na clínica (GUPTA *et al*, 2013; ENGEL *et al*, 2015), novas alternativas quimioterápicas estão sendo desenvolvidas a fim da descoberta de novos fármacos esquistossomicidas.

Dentro desse contexto, os derivados tiossemicarbonas, compostos orgânicos nitrogenados, surgem como perspectivas de novos protótipos atuantes frente ao parasito *Schistosoma*. Essas moléculas já apresentam diversas atividades biológicas citadas em estudos antiparasitários, tais como atividades leishmanicida

(MELOS et al., 2015), tripanocida (ESPÍNDOLA et al., 2015, COSTA et al., 2016), antimalárica (KUMAR et al., 2014) e, também, esquistossomicida (SANTIAGO et al., 2014).

Dessa forma, devido à importância da descoberta de fármacos para o tratamento da esquistossomose, mais eficazes na forma juvenil, como também ao amplo potencial biológico esquistossomicida, o presente trabalho visa descrever a atividade *in vitro*, *in vivo* e ultraestrutural de vermes adultos e jovens de *S. mansoni* frente aos derivados indol-tiossemicarbazonas.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial esquistossomicida dos novos derivados indol-tiossemicarbazonas.

1.1.2 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar o potencial citotóxico dos derivados indol-tiossemicarbazonas em linhagem de células macrofágicas;
- ✓ Verificar a atividade esquistossomicida *in vitro* dos derivados indol-tiossemicarbazonas sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*;
- ✓ Verificar a atividade esquistossomicida *in vitro* dos derivados indol-tiossemicarbazonas (LqIT/LT-51, LqIT/LT-55 e LqIT/LT-58) sobre vermes jovens de *Schistosoma mansoni* com os melhores derivados da série LT.
- ✓ Analisar por microscopia eletrônica de varredura as alterações morfológicas dos vermes adultos e jovens de *Schistosoma mansoni* submetidos ao tratamento com o melhor derivado da série LT;
- ✓ Realizar o ensaio de fragmentação do DNA genômico dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* submetidos ao tratamento com o derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51;
- ✓ Realizar o ensaio de toxicidade aguda com o derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51;
- ✓ Verificar a suscetibilidade *in vivo* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* frente ao derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51;

- ✓ Determinar a carga parasitária dos animais submetidos à terapia com derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são um grupo de doenças com características distintas que afetam em todo o mundo mais de um bilhão de pessoas, principalmente aquelas encontradas em países em desenvolvimento. As populações mais acometidas geralmente são aquelas que vivem na linha de pobreza em lugares remotos, zonas rurais e favelas urbanas, onde não se encontra saneamento básico adequado (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 2010; WHO, 2012, 2015). Assim, as DTNs causam significativa morbidade, enfermidades, sofrimento e morte, gerando consequências graves no âmbito social, econômico e psicológico entre os indivíduos afetados (DIAS *et al.*, 2013).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) relata que as DTNs são causadas por 17 diferentes tipos de agentes infecciosos e parasitárias como vírus, bactérias, protozoários e helmintos (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 2010). Entre essas enfermidades, a esquistossomose se destaca por apresentar potencial morbidade, como cronicidade da doença, deficiência cognitiva, estafa e problemas no crescimento, sendo considerada um problema de saúde pública, além de sua alta mortalidade (ABDULLA *et al.*, 2007; WHO, 2012, 2013, 2015).

Outro aspecto a ser considerado é o número de internações e óbitos devido à esquistossomose mansônica, divulgados pelo Sistema Único de Saúde (SUS) para o Brasil, com 1469 internações entre o ano de 2010 e 2016 e com 2955 mortos entre 2010 e 2015 (MS, 2017, 2017a). Esses dados mostram que o número de mortes é superior ao número de internações, o que é preocupante para a população, levando a crer que eles não estão sendo assistidos suficientemente pela saúde básica e nem recebendo tratamento adequado e oportuno.

O controle da esquistossomose é um desafio nos países endêmicos, visto que saneamento básico e educação sanitária são demandadas de alto custo. Adicionalmente, é importante destacar que parte da população carente depende de água para irrigação, lazer e atividades domésticas. Entretanto, a aplicação de

políticas sociais que visam à implementação de hábitos seguros para o uso da água muitas vezes é negligenciada (EVAN SECOR, 2014).

As DTNs também são caracterizadas como “negligenciadas” devido à falta de interesse das indústrias farmacêuticas que não vislumbram potenciais compradores dos medicamentos para essas doenças, além da falta de financiamento em pesquisas pelas agências de fomento (ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS, 2010). Isso é comprovado, visto que dos 1.556 medicamentos aprovados entre 1975 e 2004, apenas 21 (1,3%) foram direcionados para as DTNs (DNDi, 2017). Com isso, no momento, as terapias encontradas para as DTNs são limitadas, insuficientes e com vários inconvenientes (baixa eficácia em parte das fases evolutivas dos parasitos, alta toxicidade, efeitos adversos e desenvolvimento de cepas resistentes) (DIAS *et al.*, 2013).

2.2 A QUIMIOTERAPIA DA ESQUISTOSSOMOSE

O tratamento da esquistossomose é fundamental principalmente para cura do paciente, mas também para o controle da morbidade, da transmissão, interrompendo o ciclo evolutivo do parasito, e para evitar o surgimento de novos casos (KATZ & ALMEIDA, 2003; SAVIOLI *et al.*, 2004; BRASIL, 2005).

A quimioterapia é um fator importante para essa parasitose. Porém, ações governamentais como o saneamento básico, instalação de rede de água tratada e esgoto nas casas, além de educação em saúde, são formas de contribuir para o controle da transmissão desta parasitose (KATZ & COELHO, 2008).

Ao longo de quase um século, diversos fármacos vêm sendo estudados e propostos como quimioterápicos para a esquistossomose, dentre eles o tártaro emérito, antimoniais trivalentes, lucantone, hicantone e o niridazol. O alto efeito tóxico e as vias de administrações parenterais desses compostos foi responsável pela descontinuidade de fabricação e uso no tratamento da doença, e pela permanência exclusiva do PZQ (KATZ & ALMEIDA, 2003).

2.2.1 Praziquantel (PZQ)

O PZQ (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino{2,1-a}isoquinolina-4-ona) (Figura 1) se tornou o fármaco de escolha por vários motivos. Dentre estes, sua eficácia contra todas as espécies de *Schistosoma* e boa

tolerância, ao mesmo tempo em que possui um menor custo e menor toxicidade em comparação aos outros compostos esquistossomicidas anteriormente utilizados (TALLIMA & RIDI, 2007). Além disso, pode ser utilizado em larga escala e em dose única oral com ausência de efeitos colaterais muito graves, mostrando eficácia, segurança e facilidade na administração (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995; KATZ, 2008a).

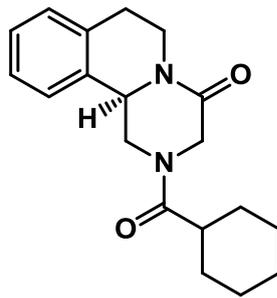


Figura 1 - Estrutura química do PZQ.

Os mecanismos de ação do PZQ frente ao *Schistosoma* ainda não foram bem elucidados (PICA-MATTOCCIA *et al.*, 2007), mas as evidências apontam para alterações nos canais de cálcio, devido ao rápido influxo de Ca^{2+} para o interior do parasito e com base nas características estruturais e funcionais das subunidades- β desses canais (CUPIT & CUNNINGHAM, 2015). Isso seria responsável pela contração muscular dos parasitos, conseqüentemente a cessação dos movimentos e redução do seu comprimento (PICA-MATTOCCIA & CIOLI, 2004), danos ao tegumento e formação de bolhas na superfície (vacuolizações), principalmente nos machos (TALLIMA & RIDI, 2007), e alterações metabólicas (captação de glicose, excreção de lactato, diminuição do glicogênio, diminuição da fosfatase alcalina e diminuição da ATPase, inibição da colinesterase e acetilcolinesterase) (NOEL, 2008).

O principal problema do PZQ é a baixa eficácia nas formas juvenis do *Schistosoma*. O PZQ é eficaz nas formas larvais por até sete dias após a contaminação, e assim, começa a ocorrer a diminuição de sua atividade, voltando a sua eficácia após 40 dias de infecção. Assim, nas regiões de alta transmissão, o PZQ deve ser administrado repetidamente quatro a seis semanas, após a primeira dose, para que ocorra a remoção dos parasitos que se tornaram adultos neste período (CAFFREY, 2015).

A literatura ainda destaca relatos de baixas taxas de cura do PZQ em um surto no Senegal (STELMA & TALLA, 1995) e Egito (ISMAIL et al, 1996). Dessa forma, a baixa eficácia frente às formas jovens do *Schistosoma* e a preocupação com o surgimento de novos casos de resistência ao PZQ, levam a necessidade de se desenvolver novos tratamentos para a esquistossomose.

2.3 QUÍMICA MEDICINAL E O PLANEJAMENTO DE FÁRMACOS PARA A ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

A descoberta e o desenvolvimento de um novo fármaco é um processo longo que requer complexo planejamento e alto financiamento, possuindo suas raízes altamente ligadas às 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, concedendo melhorias na qualidade de vida das pessoas (GUIDO & OLIVA, 2009).

A evidenciação de um potencial alvo biológico (macromolécula, enzima ou receptor) relacionado a doença é a primeira etapa para o descobrimento de um fármaco. Após definição desse alvo, os estudos são direcionados para a busca de compostos ligantes (*hits*) que sejam capazes de atuar sobre a atividade *in vitro*. Esses *hits* podem ser identificados como bioativos, através de triagens experimentais (biológicas, bioquímicas), virtuais/computacionais (*HTS– High Throughput Screening–* triagem de alto rendimento) ou por meio de planejamento molecular (ELEBRING; GILL; PLOWRIGHT, 2012; DUFFY et al., 2012).

Os esforços na pesquisa de um novo fármaco se direcionam a fase farmacodinâmica, na qual se verificam a interação fármaco-alvo e conseqüentemente seus efeitos terapêuticos. Testes *in vitro* são realizados para testar os candidatos a fármacos, buscando-se obter a relação do seu potencial agonista ou antagonista. Partindo-se dessa triagem inicial, outros testes são realizados *in vivo* para verificar o possível efeito farmacológico. No entanto, muitos compostos promissores que se mostram com boa atividade nos testes *in vitro*, nem sempre têm uma mesma resposta no teste *in vivo*. Muitas vezes essa falha corresponde a problemas farmacocinéticos dos compostos, como sua baixa

biodisponibilidade, baixa ou alta duração de ação e até a presença de metabólitos, gerando problemas clínicos mal sucedidos (PEREIRA, 2007).

Os processos de absorção, distribuição, biotransformação e excreção nos estágios iniciais da pesquisa são de suma importância. 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 em pesquisas (PEREIRA, 2007).

Assim, a química medicinal vem se destacando no desenvolvimento e produção de fármacos (GUIDO & OLIVA, 2009), além de investigar as razões moleculares da ação dos *hits* e a relação entre a estrutura química e sua atividade farmacológica (BARREIRO, 2015). Dentro desse contexto, várias estratégias são empregadas, aplicando-se desde o desenho molecular até a síntese de um novo fármaco, possível candidato a agente terapêutico. Essas estratégias são essenciais, uma vez que aperfeiçoam modificações moleculares, conseqüentemente diminuindo efeitos colaterais e aumentando seu potencial (BARREIRO, 2009).

As estratégias da química medicinal aplicadas ao planejamento e modificação de fármacos incluem o bioisosterismo, hibridação molecular, simplificação molecular, química computacional e combinatória (*Quantitative Structure-Activity relationship*-QSAR e modelagem molecular) (SILVA, 2014). Dentre essas técnicas, destacamos neste trabalho a hibridação molecular.

A hibridação molecular é uma estratégia de desenho racional de novos ligantes ou protótipos, baseados no reconhecimento de farmacóforos na estrutura molecular de dois ou mais derivados bioativos conhecidos. Através da fusão adequada desses fragmentos, é possível uma condução para o desenho de novos híbridos que mantenham as características pré-selecionadas dos modelos originais (SAMALA et al., 2014).

A inovação terapêutica tornou-se mais desafiadora, devido à proliferação de potenciais alvos macromoleculares, resultantes de avanços da genômica e da biologia molecular e estrutural. Isso exigiu uma forte ênfase em estratégias moleculares e computacionais altamente integradas, levando respostas aos estágios pré-clínicos dos testes de fármacos. Assim, a bioinformática vem desempenhando um papel central no processo de descoberta, dado como exemplo os bancos de dados (*SchistoDB* e *Gene DB*) atualmente disponíveis, que contêm informações

sobre transcriptomas, proteomas, metabolomas, sequência de proteína e estrutura, bem como interações proteína-ligante. No cenário atual, a bioinformática tem uma relação sinérgica com a química medicinal, modelagem molecular e descoberta de fármacos (FERREIRA, OLIVA & ANDRICOPULO, 2015).

Os métodos computacionais em química medicinal são amplamente classificados em Design de Fármaco Baseado na Estrutura do Receptor (SBDD, do inglês *Structure-Based Drug Design*) e Design de Fármaco Baseado no Ligante (LBDD, do inglês *Ligand-Based Drug Design*) (FERREIRA, OLIVA & ANDRICOPULO, 2015). A aplicação de estratégias de SBDD e LBDD na descoberta de medicamentos para esquistossomose ainda é um campo em evolução que progrediu com os avanços científicos e tecnológicos recentemente alcançados na descoberta de medicamentos para as DTNs. Isso é demonstrado pelo surgimento de programas robustos que adotam sistematicamente essas metodologias, como (MAFUD et al., 2016):

➔ A-ParaDDisE (*Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics*) (<http://a-paradise.cebio.org>) – Utiliza as técnicas de SBDD para identificar e caracterizar enzimas modificadoras de histonas (HMEs), como a histona desacetilases (HDACs), como alvos de fármacos para esquistossomose e outras doenças tropicais. Após a caracterização do alvo, são empregados rastreios baseados em alto rendimento e acoplamento molecular para identificar os inibidores de HME, que são ainda avaliados em ensaios fenotípicos utilizando parasitas *in vitro*;

➔ OSDD (*Open Source Drug Discovery*) (www.osdd.net/home) - Aplica uma combinação de métodos SBDD e LBDD, como modelos de acoplamento molecular e classificação, respectivamente, para descobrir novos inibidores de alvos moleculares específicos.

2.3.1 Redirecionamento de fármacos

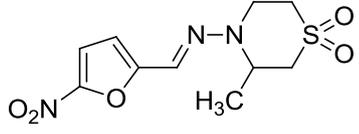
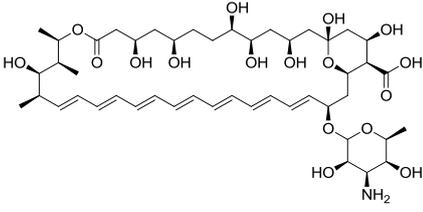
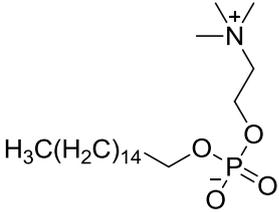
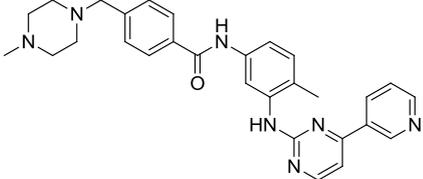
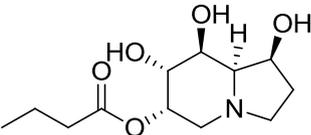
Mesmo com os avanços científicos e de financiamento, surgiu o reposicionamento de fármacos nas doenças negligenciadas (ANDREWS et al., 2014), podendo ser encontrado como reutilização de fármacos, reconfiguração, redirecionamento ou resgate. Esta estratégia consiste em encontrar novas

indicações para medicamentos já comercializados ou para compostos de investigação altamente caracterizados (FERREIRA E ANDRICOPULO, 2016).

O reposicionamento de fármacos resulta-se na descrição do recurso de ação desse fármaco, que pode ser através da identificação de novas aplicações (por exemplo, seleção de ingredientes farmacêuticos ativos para descobrir ou sugerir novos usos), do uso de novas aplicações (ou seja, uso fora do rótulo no tratamento do paciente real), ou ainda no desenvolvimento de novas aplicações (ou seja, desenvolvimento para uma nova autorização de comercialização) (LANGEDIJK et al., 2015).

Esta estratégia já possui algumas histórias de sucesso que apoiam seu uso. A Tabela 1 lista alguns medicamentos que chegaram à clínica para uma nova indicação em DTNs, junto com aqueles ainda em desenvolvimento clínico.

Tabela 1. Medicamentos reutilizados com sucesso e reposicionamento de candidatos em ensaios clínicos para doenças tropicais negligenciadas

Fármaco	Estrutura	Uso original	Novo uso	Referência
Nifurtimox		Doença de Chagas	Tripanossomíase Humana Africana	Alirol et al., 2013
Anfotericina B		Infecções fúngicas	Leishmaniose	Wong-Beringer et al., 1998
Miltefosina		Neoplasia maligna	Leishmaniose	Sindermann et al., 2004
Imatinibe		Neoplasia maligna	Filariose	(https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02644525)
Celgosivir		Hepatite C	Dengue	(https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02569827)

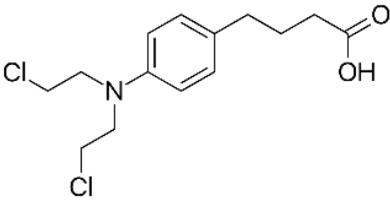
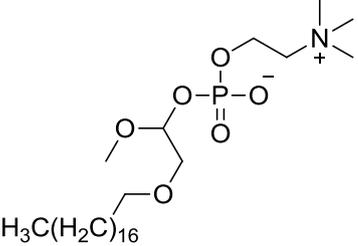
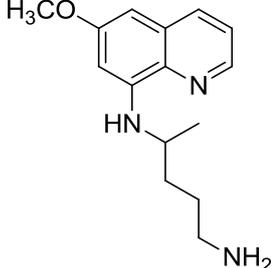
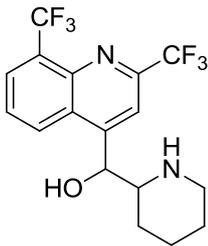
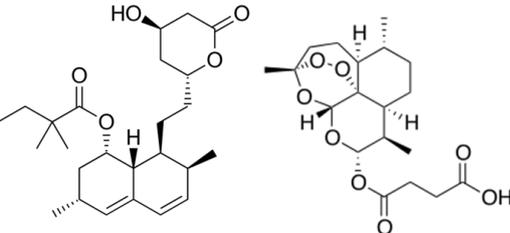
Adaptado de Ferreira e Andricopulo, 2016

Para a esquistossomose, em particular, essa reutilização de medicamentos existentes (recentemente referida como "*piggy backing*") tem potencial na identificação de novos fármacos para seu tratamento, especialmente com alguns fármacos contra o câncer que estão atualmente na clínica ou em desenvolvimento (LEE e FAIRLIE, 2015).

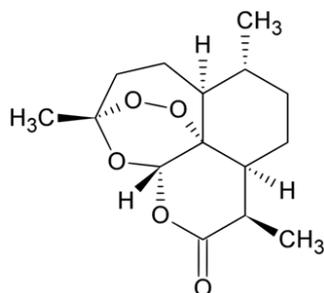
Esse fato pode ser explicado, uma vez que a apoptose é a via mais comum de morte celular em humanos e vem sendo estudada para o desenvolvimento de tratamentos para o câncer, assim como para a esquistossomose. Através do sequenciamento do genoma e do transcriptoma foi possível identificar os componentes celulares responsáveis pela via apoptótica. Assim, muitos fármacos

anti-neoplásicos e de outras funcionalidades estão sendo direcionados em estudos para a esquistossomose (LEE e FAIRLIE, 2015).

Tabela 2. Medicamentos da clínica avaliados biologicamente para serem reposicionados ao tratamento da esquistossomose.

Fármaco	Estrutura	Uso original	Referência
Clorambucila		Agente anti-neoplásico (leucemia crônica e linfoma não Hodgkin)	Eissa et al., 2017
Edelfosina		Antitumoral e leishmanicida (<i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>)	Yepes et al., 2014
Mefloquina		Malária	Manneck et al., 2010
Primaquina		Malária	Kamel et al., 2017
Sinvastatina + Artesunato		Redutor de colesterol (LDL) + Malária	Alencar et al., 2016

Artemisina



Malária

El-Beshbishia et al.,
2015

2.4 NOVAS ALTERNATIVAS TERAPÊUTICAS PARA A ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

2.4.1 Tiossemicarbazonas

As tiossemicarbazonas (Figura 2) são compostos orgânicos nitrogenados pertencentes à família das iminas, também denominadas bases de Schiff. Apresentam a estrutura básica $R_1R_2C=N(NH)-C=S(-N)R_3R_4$ e constituem uma importante classe de ligantes N, S-doadores e apresentam diferentes modos de coordenação, dependendo dos reagentes de partida e das condições de reação para sua obtenção (TENÓRIO *et al.*, 2005; LOBANA *et al.*, 2009).

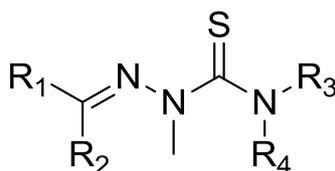


Figura 2 - Esqueleto da tiossemicarbazona

Esses compostos apresentam como característica principal sua versatilidade de obtenção, com rendimentos satisfatórios e sua vasta aplicação como intermediários de muitos núcleos importantes. A síntese de tiossemicarbazonas geralmente envolve a condensação quimiosseletiva de tiossemicarbazidas com aldeídos ou cetonas, sendo comumente necessária a utilização de catálise ácida (TENÓRIO *et al.*, 2005).

As tiossemicarbazonas também servem para a ciclização de compostos heterocíclicos, como *scaffold*, para a síntese com anéis tiazóis, 4-tiazolidinonas e derivados tiazolidinônicos (DAWOOD *et al.*, 2015).

As tiossemicarbazonas apresentam um amplo perfil farmacológico, sendo uma importante classe de compostos, cujas propriedades têm sido extensivamente estudadas na química medicinal, particularmente, na química medicinal inorgânica (TENÓRIO *et al.*, 2005) como, leishmanicida (MELOS *et al.*, 2015), tripanocida (ESPÍNDOLA *et al.*, 2015), antimalárico (KUMAR *et al.*, 2014) e esquistossomicida (FONSECA *et al.*, 2015; SANTIAGO *et al.*, 2014 e MAHRAN *et al.*, 2007)

2.4.2 Compostos heterocíclicos

Os heterocíclicos são compostos carbocíclicos que apresentam um ou mais átomos de carbono do anel que são substituídos por heteroátomos tais como, nitrogênio, enxofre e oxigênio (SRAVANTHI e MANJU, 2016). Eles vêm se estabelecendo na Química Medicinal como uma classe de compostos bioativos, já existindo um grande número de moléculas bioativas (VERMA & SARAF, 2008).

Assim, este trabalho apresenta dois anéis heterocíclicos importantes em fármacos presentes na clínica e nos compostos que estão sendo desenvolvidos presentes em estudo na literatura, são o anel indólico e anel tiazolidinônico.

2.4.2.1 Indol

O Indol (Figura 3) é um sistema heterocíclico, bicíclico planar, resultado da fusão do benzeno de seis membros e o anel pirrol de cinco membros compartilhado por uma ligação dupla (CHADHA e SILAKARI, 2017). A eletrofilicidade do núcleo já é bem descrita na literatura acarretando na síntese de vários derivados de indol através de adição nucleofílica e cicloadição (BANDINI, 2013). Esta propriedade do indol melhora o portfólio para a manipulação sintética (CHADHA e SILAKARI, 2017)

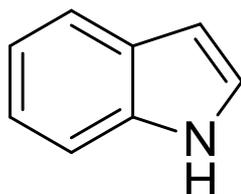


Figura 3 - Esqueleto do Indol

O indol é um importante sistema heterocíclico, porque é incorporado em proteínas na forma do aminoácido triptofano, é um fitoconstituente em várias plantas e também produzido por uma variedade de bactérias (CHADHA e SILAKARI, 2017). Além do triptofano, tem-se a serotonina, neurotransmissor atuante no sistema nervoso, sistema cardiovascular e sistema gastrointestinal e a melatonina, fármaco que age no controle do sono (SRAVANTHI e MANJU, 2016). Assim, se torna uma base para demais fármacos existentes na clínica como, a indometacina e fornecendo o esqueleto para alcalóides indólicos biologicamente ativos de plantas, como a estricnina e LSD (SHARMA, KUMAR e PATHAK, 2010).

2.4.2.2 Tiazolidinona

O tiazol é formada por anel de cinco membros, sendo que dois destes são heteroátomos (um átomo de nitrogênio e um átomo de enxofre). Enquanto que seu análogo a tiazolidinona (Figura 4), se diferencia pela presença de uma carbonila na posição quatro do anel tiazol (SU et al., 2017).

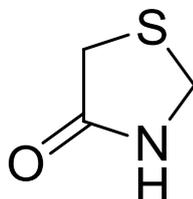


Figura 4 - Esqueleto da 4-tiazolidinona

Os derivados da tiazolidinona são de grande interesse devido à sua ampla gama de efeitos farmacológicos, incluindo atividades antimalárica (MARELLA et al., 2014; KUMAR et al., 2014), leishmanicida (BRITTA et al., 2014), anti-*T. cruzi* (MORENO-RODRÍGUEZ et al., 2014; CARDOSO et al., 2014) e esquistossomicida (SANTIAGO et al., 2014).

Assim, o anel de tiazolidina é reconhecido como um importante andaime para o desenvolvimento de fármacos, com isso, a química da tiazolidina tem sido amplamente estudada (SU et al., 2017).

3 METODOLOGIA

3.1. LOCAL

O estudo foi realizado em colaboração com os seguintes laboratórios:

- Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LqIT/UFPE), onde foi realizada as sínteses dos derivados indol-tiossemicarbazonas, as caracterizações físico-químicas e a interpretação das caracterizações estruturais por meio do RMN¹H, ¹³C, IV e espectrometria de Massas;
- Central Analítica – Departamento de Química Fundamental (DQF/UFPE), onde foi realizada as caracterizações estruturais por meio do RMN¹H, ¹³C, IV e espectrometria de Massas;
- Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LBCM/IAM - FIOCRUZ), onde foi realizado os testes de citotoxicidade, *in vitro* e *in vivo* para *S. mansoni*.
- Biotério (IAM – FIOCRUZ), local de acondicionamento dos animais utilizados nos experimentos *in vitro* e *in vivo*.
- Setor de Malacologia do Laboratório de Esquistossomose e do Serviço de Referência em Esquistossomose do Instituto Aggeu Magalhães (IAM), local de acondicionamento dos caramujos e recuperação das cercarias.
- Laboratório de Microscopia Eletrônica (LIKA/UFPE), onde foi preparado as amostras de *S. mansoni*, a partir das quais, foram obtidas as imagens de MET e MEV;
- Laboratório de Biotecnologia (LIKA/UFPE), onde foi realizado os testes com DNA genômico.

3.2 DELINEAMENTO DA PESQUISA

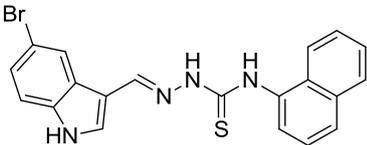
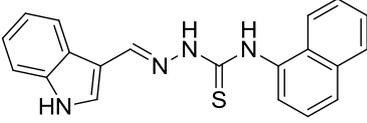
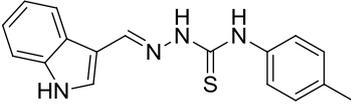
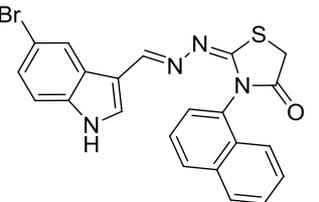
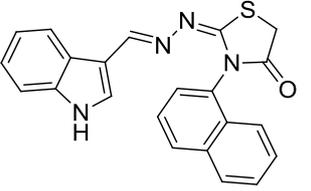
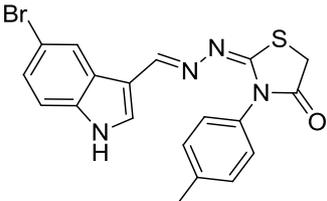
Foi realizada uma pesquisa experimental através de ensaios *in vitro*, *in vivo* e ultraestrutura de vermes adultos e jovens de *S. mansoni*.

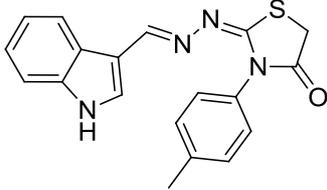
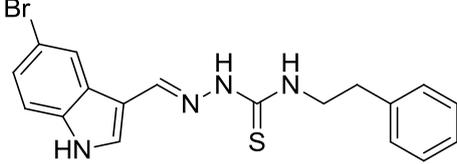
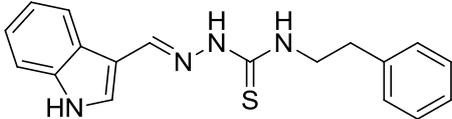
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS – ESTUDO QUÍMICO

3.3.1 Derivados indol-tiossemicarbazonas do estudo

Os derivados indol-tiossemicarbazonas foram obtidos por síntese como descrito por Oliveira e colaboradores (2017), sendo quimicamente caracterizado por RMN, infravermelho e espectros de massa. Na Tabela 3 segue a descrição dos derivados utilizados neste estudo.

Tabela 3: Derivados indol-tiossemicarbazonas utilizados no estudo

Código	Estrutura	Nome químico	Massa Molar (g/mol)
LqIT/LT-50		(<i>E</i>)-2-((5-bromo-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -(naftalen-1-il)hidrazinacarbotoamida	422,0201
LqIT/LT-51		(<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -(naftalen-1-il)hidrazinacarbotoamida	344,1096
LqIT/LT-53		(<i>E</i>)-2-((1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)- <i>N</i> -(<i>p</i> -toluil))hidrazinacarbotoamida	308,1096
LqIT/LT-54		(<i>E</i>)-2-((<i>E</i>)-((5-bromo-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)hidrazono)-3-(naftaleno-1-il))tiazolidin-4-ona	462,0150
LqIT/LT-55		(<i>E</i>)-2-((<i>E</i>)-((1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)hidrazono)-3-(naftaleno-1-il))tiazolidin-4-ona	384,1045
LqIT/LT-56		(<i>E</i>)-2-((<i>E</i>)-((5-bromo-1 <i>H</i> -indol-3-il)metileno)hidrazono)-3-(<i>p</i> -toluil)tiazolidin-4-ona	426,0150

LqIT/LT-57		(E)-2-((E)-((5-bromo-1H-indol-3-yl)methylene)hidrazono)-3-(p-toluil)tiazolidin-4-ona	348,1045
LqIT/LT-58		(E)-2-((5-bromo-1H-indol-3-yl)methylene)-N-fenilhidrazinacarbotioamida	400,0357
LqIT/LT-59		(E)-2-((1H-indol-3-yl)methylene)-N-fenilhidrazinacarbotioamida	322,1252

3.4 MATERIAIS E MÉTODOS – ESTUDO BIOLÓGICO

3.4.1 Citotoxicidade em células macrofágicas J774A.1

Foram utilizados macrófagos da linhagem J774 para os ensaios *in vitro* de determinação da viabilidade celular. Essas células foram mantidas em garrafas de cultura em 5 mL de meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) com soro fetal bovino (SFB) a 10%. No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB.

Os macrófagos foram tripsinizados e foram plaqueados em placas de 96 poços, fundo chato e incubadas por 24h, a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, para aderência. Após esse tempo, os compostos foram adicionados nas concentrações de 200 a 12,5 µg/mL e incubados novamente por um período de 24h. Foram utilizados poços apenas com meio de cultura como controle negativo, e com praziquantel como controle positivo. Após a incubação foi acrescentado 25µL de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo difenil tetrazólio) a 5mg/mL em PBS, seguida de uma nova incubação por 2h, a 37°C e ao abrigo da luz. Todo o meio de cultura juntamente com o restante de MTT foi aspirado e 100µL de DMSO foi adicionado por poço para solubilização dos cristais de formazan resultantes da redução do MTT. Foi realizada a leitura da absorbância a 540 nm no

espectrofotômetro THERMO SCIENTIFIC Multiskan FC. A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC50) foi determinada por análise de regressão pelo software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

3.4.2 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro*

3.4.2.1 Animais

Foram utilizados 20 camundongos machos com 30 dias de idade, pesando aproximadamente 30 gramas, albinos suíços (*Mus musculus*) mantidos no Instituto Aggeu Magalhães (IAM – FIOCRUZ/Recife), em gaiolas individuais, sob condições padronizadas de temperatura, luminosidade e alimentação. A utilização desses animais no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) sob licença nº 69/2014 (Anexo A).

3.4.2.2 Infecção por *Schistosoma mansoni*

Após 15 dias do recebimento dos camundongos, os animais foram infectados por via percutânea, utilizando cerca de 120 cercárias (Cepa LE), oriundas de *Biomphalaria glabrata*, para cada animal. Para vermes adultos, após 45 dias de infecção, foi realizado exame parasitológico das fezes dos camundongos para avaliar a positividade da infecção (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934).

3.4.2.3 Perfusão do sistema porta para recuperação de vermes jovens e adultos de *Schistosoma mansoni*

Os camundongos foram submetidos a eutanásia após 30 e 49 dias, respectivamente, de infecção. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de ketamina (100-200 mg/Kg) associada a cloridrato de xilasina (5-16 mg/Kg). Após anestesia, os animais foram submetidos à perfusão do sistema porta hepático e através da busca via mesentério para a recuperação dos vermes, os quais foram separados em placas de petri contendo meio RPMI-1640 e em seguida os parasitos foram contados e classificados, de acordo com o sexo e vitalidade (DUVAL & DEWITT, 1967).

3.4.2.4 Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* frente aos derivados indol-tiossemicarbazonas

Os parasitos foram recuperados dos camundongos infectados e posteriormente lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20 mM pH 7,5 e suplementado com penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e soro bovino fetal a 10 % em uma placa de petri. Após a lavagem os vermes adultos foram transferidos para placas de cultura de tecidos contendo 1 mL de meio RPMI-1640 suplementado.

Para cada concentração foram utilizados 3 poços da placa de cultura e foram acrescidos a cada poço 4 vermes (2 casais), em seguida foram incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após o período de 2 horas de adaptação ao meio, os derivados indol-tiossemicarbazonas foram adicionados nas concentrações de 200 µM para se fazer um *screening* inicial para verificar quais os derivados que seriam ativos para esta concentração e com isso, num segundo momento iríamos realizar um outro teste *in vitro* com as demais concentrações (100 µM, 50 µM e 25 µM). Utilizou-se o praziquantel (10 µM) como controle positivo dos experimentos e meio com DMSO a 1,6% como controle negativo. Os parasitos foram mantidos em cultura por 5 dias sendo monitorados a cada 24 horas e observados no microscópio óptico invertido (BestScope BS-2090) para avaliação da atividade motora, oviposição e a taxa de mortalidade. Para confirmação dos resultados, todos os ensaios foram realizados em duplicata e triplicata biológica.

Os vermes adultos de *S. mansoni* expostos aos derivados indol-tiossemicarbazona, ao PZQ (controle positivo) e Meio+DMSO 1,6% (controle negativo) foram observados por um período, obedecendo aos critérios criados por Maneck (2010) utilizando *scores* (0, 1, 2 e 3) para cada movimento analisado.

- *Score* 3: Vermes ativos, movimentos corporais normais do parasito;
- *Score* 2: Vermes lentos, diminuição dos movimentos corporais do parasito;
- *Score* 1: Vermes muito lentos, retardamento dos movimentos corporais, apresentando apenas movimentos cefálicos, cauda e ausência de mobilidade, além dos movimentos intestinais;

- *Score 0*: Vermes imóveis/mortos, ausência total dos movimentos corporal e cefálico do parasito.

Após esse teste *in vitro* preliminar, os derivados mais ativos foram submetidos a mesma metodologia citada acima, agora utilizando esses derivados nas concentrações de 100 μ M, 50 μ M e 25 μ M.

3.4.2.5 Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de vermes jovens de *Schistosoma mansoni* frente aos derivados indol-tiossemicarbazonas

Os derivados indol-tiossemicarbazonas que foram mais promissores nos resultados no ensaio *in vitro* para vermes adultos, foram selecionados para seguir para o ensaio *in vitro* para vermes jovens.

O mesmo protocolo e parâmetros utilizados para os ensaios *in vitro* para vermes adultos, foi o mesmo utilizado para vermes jovens, no entanto todas as concentrações (200 μ M, 100 μ M, 50 μ M e 25 μ M) dos derivados indol-tiossemicarbazonas foram utilizados no mesmo experimento. Para confirmação dos resultados, todos os ensaios foram realizados em duplicata.

3.4.2.6 Ensaio de viabilidade dos parasitos

Para confirmação do efeito da viabilidade dos vermes adultos e jovens de *S. mansoni*, foi realizado o ensaio baseado no 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (MTT). Com 24 horas de tratamento com o derivado mais promissor, controle positivo e negativo, um casal de vermes foi transferido para poços de placas de cultura (com 96 poços) que continham 100 μ L de MTT (5mg/mL em solução salina tamponada com fosfato, PBS à 0,2M) com pH 7,4 e foram incubadas a 37°C durante 2 horas. Depois, a solução de MTT foi substituída por 200 μ L de DMSO, para dissolução dos cristais de formazan, à temperatura ambiente durante 1 hora. A absorbância foi lida a 550 nm, em um leitor de microplacas (M680, da Bio-Rad Laboratories, Inc.).

Esse procedimento foi realizado com vermes adultos e jovens tratados, controle negativo e controle positivo nas mesmas condições experimentais. A concentração citotóxica para 50% da cultura (CC₅₀) e a concentração citotóxica para

95% da cultura (CC_{95}) foi determinada por análise de regressão pelo software GraphPad Prism. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

3.4.2.7 Ensaio de fragmentação do DNA

Para a análise da fragmentação do DNA, vermes adultos de *S. mansoni* foram expostos com o derivado mais promissor da série por 24 horas, onde foram lavados com PBS e triturados com nitrogênio líquido, com uma solução de Proteinase K (5 mg/mL) e STE, e foi incubado em temperatura ambiente por 5 minutos. Adiciona o acetato de amônio (7,5 M), incuba no gelo por 15 min e centrifugar a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. O DNA foi extraído com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (1:1:1, v/v/v) e logo, foi centrifugado a 14000 rpm por 5min, adicionado isopropanol a fase aquosa para precipitação do DNA. Após centrifugação durante 10 min a 13000 rpm à 4°C, o sedimento de DNA foi ressuspendido com 50ug/mL de RNase.

O DNA foi quantificado no NanoDrop 2000 Thermo Fisher e então analisado através de gel de agarose a 1% contendo 0,1 mg/mL de brometo de etídio e TBE. Foi utilizado como controle negativo, o DNA do parasito sem tratamento e como controle positivo, a ciclofosfamida.

3.4.3 Avaliação da atividade esquistossomicida ultraestrutural

3.4.3.1 Microscopia Eletrônica de Varredura

Para verificar as alterações tegumentares dos vermes adultos e jovens de *S. mansoni* causados pelos derivados tiossemicarbazônicos, os vermes adultos e jovens foram incubados por aproximadamente 24 horas, apresentando atividade motora baixa ($score = 1$), logo após as amostras foram lavados com tampão cacodilato de sódio (pH=7,2), fixados com 2,5% de glutaraldeído (GA) (pH = 7,4) durante 24 horas, e depois fixados com tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% por 1 hora. As amostras foram desidratadas por uma quantidade crescente de etanol, secas em um secador de ponto crítico, depois foram montadas em stubs e revestidas com ouro usando uma máquina de pulverização. O exame das preparações e a obtenção das eletronicografias foram realizados através do microscópio eletrônico de varredura JEOL - 5600 LV.

3.4.4 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vivo*

3.4.4.1 Ensaio de toxicidade aguda oral

O teste de toxicidade aguda oral foi baseado na OECD/OCDE - 425/2008 - OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP), com modificações.

Foram utilizados dois grupos de seis camundongos Swiss *Mus musculus* fêmeas pesando aproximadamente 30 gramas, onde foram deixados em jejum por 4 horas e tratados via oral (v.o.) com o derivado indol-tiossemicarbazona selecionado na dose de 2000 mg/Kg e salina 10 mL/Kg. Os animais foram observados continuamente nas primeiras 4 horas de avaliação a fim de verificar sinais clínicos de toxicidade e diariamente por 14 dias. Além disso, também foi acompanhado o peso dos animais nos tempos 0 e 14 dias.

Os seguintes parâmetros foram avaliados: efeitos na locomoção, comportamento (agitação, atividade reduzida, sonolência), respiração, salivação, lacrimejamento, cianose de extremidades, straub, ptosis e mortalidade. Ao final do experimento os animais foram pesados, posteriormente submetidos à eutanásia por anestésicos (100-200 mg/Kg de Ketamina e 5-16 mg/Kg de xilazina) e necropsiados permitindo observar macroscopicamente algum efeito tóxico nos órgãos dos animais.

3.4.4.2 Tratamento *in vivo* com o derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51

3.4.4.2.1 *Animais e grupo experimental*

Foram utilizados 40 camundongos, separados aleatoriamente, com 30 dias de idade, pesando aproximadamente 30 gramas, albinos suíços (*Mus musculus*) fêmeas mantidas no Instituto Aggeu Magalhães (IAM – FIOCRUZ/Recife), em gaiolas, sob condições padronizadas de temperatura, luminosidade e alimentação. Esses animais foram utilizados como hospedeiro definitivo e foram infectados por via percutânea com cerca de 80 cercárias (cepa LE). Cinquenta dias após a infecção, um exame parasitológico foi feito a partir das fezes desses animais para avaliar a

positividade da infecção (HOFFMAN et al., 1934). A utilização desses animais no presente trabalho foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FIOCRUZ) sob licença nº 69/2014.

As cercárias (Cepas LE) de *S. mansoni* utilizadas foram obtidas por meio do setor de Malacologia do Laboratório de Esquistossomose e do Serviço de Referência em Esquistossomose do Instituto Aggeu Magalhães (IAM).

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos:

- Grupo I → tratado com 50 µMol/Kg;
- Grupo II → tratado com 100 µMol/Kg
- Grupo III → tratado com 200 µMol/Kg
- Grupo IV → tratado com 50 µMol/Kg de PZQ;
- Grupo V → tratado com 10 mL/Kg de salina + DMSO 5%.

Os compostos foram dissolvidos em solução salina e DMSO 5%, antes da administração. A administração das doses foi realizada por via oral, após cinquenta dias da infecção por cinco dias consecutivos. O grupo não tratado recebeu o veículo e foi submetido às mesmas condições de teste.

3.4.4.2.2 Avaliação de critérios parasitológicos

Quinze dias após o tratamento, os animais foram eutanasiados por anestésico (100-200 mg/Kg de cetamina e 5-16 mg/Kg de xilazina) com perfusão do sistema portal e recuperação via mesentério para a remoção dos vermes, que foram separados em placas de Petri contendo solução salina, contados e classificados de acordo com sexo e vitalidade (DURVAL & DEWITT, 1967). Fragmentos de fígado e intestino foram removidos para quantificar ovos e análises histológicas.

3.4.4.2.3 Determinação da efetividade do tratamento

A avaliação da efetividade do tratamento foi determinada pela redução da porcentagem de carga parasitária em cada grupo tratado. A porcentagem de redução no número de vermes foi calculada pelo método de Fallon et al. (1995) da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de redução} = C - V/C. 100$$

Onde, C é o número médio de parasitas recuperados de animais não tratados infectados e V é o número médio de parasitas recuperados de animais tratados.

3.4.4.2.4 *Porcentagem de estádios de desenvolvimento do ovo (Oograma)*

Três fragmentos de aproximadamente 3 cm da porção distal do intestino delgado dos animais foram removidos, lavados em PBS e colocados em lâminas de vidro com lamínulas que foram utilizados para avaliar o desenvolvimento e maturação dos ovos, conforme descrito por Pellegrino et al. (1962). Cem ovos de cada fragmento foram escolhidos aleatoriamente, avaliados por exame microscópico e classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento, sendo a média de cada estágio por animal obtido.

3.4.5 **Análise estatística**

Os resultados experimentais foram expressos como a média \pm erro padrão (S.E.) sendo pela análise de variância (ANOVA) one-way e two-way, seguida do teste de comparação de média, Turkey e Bonferroni, e Dunnett's. Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância e representados por: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. Os cálculos foram realizados utilizando o Software estatístico GraphPad Prism versão 5.0, San Diego Califórnia, EUA.

4 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Derivados heterocíclicos, geralmente com um anel de cinco membros já vêm apresentando uma classe de compostos úteis na química medicinal, com várias moléculas bioativas (PACCA et al., 2017; MOREIRA et al., 2017; DA SILVA et al., 2017; DOS SANTOS ALIANÇA et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017).

Quando se busca trabalhos nas bases de dados que incluem as tiossemicarbazonas percebe-se o quanto que essas estruturas são privilegiadas para inúmeras atividades biológicas (TENÓRIO et al., 2005; KUMAR et al., 2014; MELOS et al., 2015; ESPÍNDOLA et al., 2015). Quando afunilamos essa pesquisa para a descoberta de novos fármacos para doenças negligenciadas, o número de trabalhos encontrados nas bases de dados diminui consideravelmente, e quando se

busca para a esquistossomose, o número de trabalhos é quase irrelevante (FONSECA et al., 2015; SANTIAGO et al., 2014 e MAHRAN et al., 2007).

Assim, se faz necessário novos investimentos no planejamento de fármacos para as doenças negligenciadas, com grande destaque para as doenças parasitárias com grande enfoque para a esquistossomose. Visto que muitos trabalhos publicados recentemente mostram o quanto que esses farmacóforos são importantes nas atividades biológicas.

4.1 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS J774A.1 DOS DERIVADOS INDOL-TIOSSEMICARBAZONAS

O potencial citotóxico dos compostos foi avaliado pela técnica do MTT e mostrou que todos foram capazes de induzir alguma toxicidade nas linhagens de macrófagos J774A.1, mas o grau de toxicidade variou entre os compostos testados (Tabela 4).

O composto LqIT/LT-53 foi o mais tóxico com a CC_{50} de 6,07 μM . O composto menos tóxico foi o LqIT/LT-54 com CC_{50} de 30,53 μM . Os demais compostos apresentaram CC_{50} entre 6,2 μM e 26,7 μM . De acordo com Figueiredo (2017) o PZQ apresenta um CC_{50} de 117,08 μM quando avaliado em células macrofágicas. Assim, podemos observar uma elevada citotoxicidade desses compostos frente aos macrófagos J774A.1 quando comparado ao PZQ.

Oliveira e colaboradores (2017) testaram os mesmos derivados deste trabalho em linhagem de células HaCat (queratinócito humano imortalizado) e verificaram que os compostos mais ativos da série, o derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51, apresentou um menor GI_{50} (0.5 μM) e os não ativos não se mostram citotóxicos. Os autores afirmam que os resultados apresentados na citotoxicidade *in vitro* não têm necessariamente repercussão nos ensaios de toxicidade *in vivo*.

O mesmo autor avaliou em outro estudo (OLIVEIRA et al., 2015) a citotoxicidade de derivados tiofeno-tiossemicarbazona em linhagem de células HaCat, o composto mais ativo na atividade antiproliferativa, o JF-3 (Figura 5), se apresentou citotóxico, no entanto, nos testes de toxicidade aguda o mesmo composto não apresentou efeitos colaterais graves.

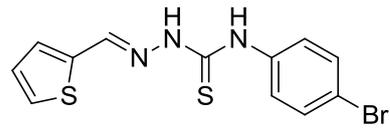


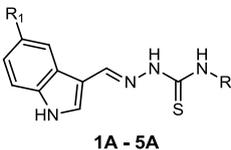
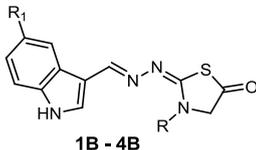
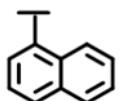
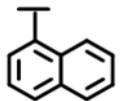
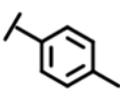
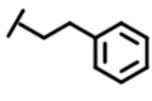
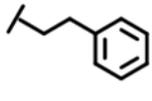
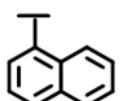
Figura 5 - Esqueleto estrutural do derivado tiofeno-tiossemicarbazona JF-3

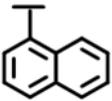
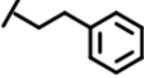
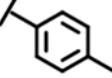
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO*

4.2.1 Alteração da viabilidade dos vermes adultos e jovens *in vitro* frente aos derivados indol-tiossemicarbazonas

Inicialmente foi realizada a avaliação dos 9 derivados *in vitro* frente a vermes adultos (*screening*) na concentração inicial de 200 μ M no período de até 120h e monitorados a cada 24h (Tabela 4).

Tabela 4: Citotoxicidade e porcentagem da mortalidade de vermes adultos de *S. mansoni* submetidos ao tratamento com os derivados indol-tiossemicarbazonas na concentração inicial de 200 μM .

 1A - 5A		 1B - 4B		Tempo (h)	Percentual de mortalidade	Citotoxicidade CC ₅₀ (μM)	Observações (vermes) 120h
Compostos	R ₁	R ₂					
1A LqIT/LT-50	Br		24	12,5	9,13	Não pareados, nenhuma aderência, ausência de ovos e alterações na morfologia do tegumento.	
			48	12,5			
			72	12,5			
			96	62,5			
			120	62,5			
2A LqIT/LT-51	H		24	100	8,82	Não pareados, nenhuma aderência, ausência de ovos e alterações na morfologia do tegumento.	
			48	100			
			72	100			
			96	100			
			120	100			
3A LqIT/LT-53	H		24	37,5	6,2	Não pareados, nenhuma aderência, ausência de ovos e alterações na morfologia do tegumento.	
			48	37,5			
			72	62,5			
			96	62,5			
			120	62,5			
4A LqIT/LT-58	Br		24	66,6	16,57	Não pareados, nenhuma aderência, ausência de ovos e alterações na morfologia do tegumento.	
			48	100			
			72	100			
			96	100			
			120	100			
5A LqIT/LT-59	H		24	0	11,05	Não pareados, nenhuma aderência, ausência de ovos e alterações na morfologia do tegumento.	
			48	30			
			72	53,8			
			96	92,3			
			120	92,3			
1B LqIT/LT-54	Br		24	6,25	30,53	Não pareados, nenhuma aderência, ausência de ovos e alterações na morfologia do tegumento.	
			48	6,25			
			72	43,75			
			96	43,75			
			120	56,25			

2B LqIT/LT-55	H		24	12,5	8,17	Não pareados, nenhuma aderência, ausência de ovos e alterações na morfologia do tegumento.
			48	31,25		
			72	100		
			96	100		
			120	100		
3B LqIT/LT-56	Br		24	0	14,37	Pareados, nenhuma aderência e presença de ovos
			48	0		
			72	0		
			96	0		
			120	12,5		
4B LqIT/LT-57	H		24	0	26,7	Não pareados, nenhuma aderência, ausência de ovos e alterações na morfologia do tegumento.
			48	0		
			72	12,5		
			96	12,5		
			120	56,25		

Conforme ilustrado na Tabela 4, todos os derivados indol-tiossemicarbazonas apresentaram mortalidade, porém o derivado LqIT/LT-51 (Figura 5) demonstrou maior eficácia com 100% de mortalidade em 24h na concentração de 200µM. Além disso, destacaram-se os derivados LqIT/LT-58 e LqIT/LT-55 (figura 6), com 100% de mortalidade em 48h e 72h, respectivamente.

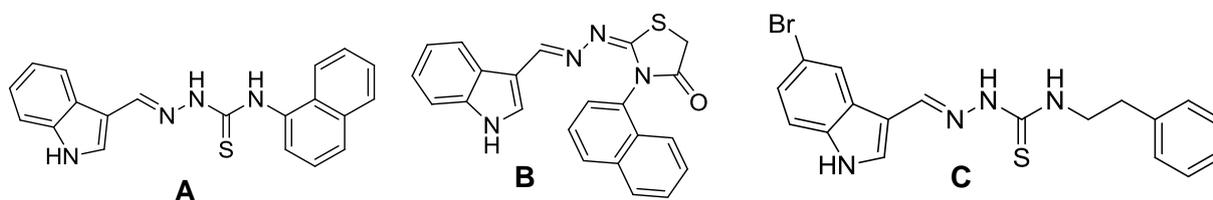


Figura 6 - Derivados indol-tiossemicarbazonas. **A.** LqIT/LT-51, **B.** LqIT/LT-55, **C.** LqIT/LT-58.

Durante as 120 horas de observação, em ambos os experimentos, os parasitos do grupo controle negativo (meio RPMI 1640 e 1,6% de DMSO) exibiram movimentos corporais e ventosas normais, com movimentos peristálticos constantes e aderência a placa de cultura. No entanto, os parasitos do grupo controle positivo (PZQ), nas primeiras 24h, perderam motilidade e morreram apresentando-se encurtados. Em contrapartida, os parasitos expostos com todos os derivados indol-tiossemicarbazonas apresentaram musculatura contorcida, presença de bolhas, ausência de ovos, não acasalados e falta de aderência à placa de cultura.

Os derivados LqIT/LT-50 e LqIT/LT-51 (Figura 7) apresentam sem suas estruturas os grupamentos naftil (verde) (posição *N*-4 da tiossemicarbazona) e indol (azul) (presente também nos demais derivados). O grupo naftil tem a capacidade de elevar a lipofilicidade da substância (Tabela 5), facilitando o transporte através das membranas biológicas, assim, permitindo a interação do composto com seu alvo biológico (CONGIU e ONNIS, 2013). E a literatura enfatiza a importância da presença de grupos volumosos na posição *N*-4 na estrutura das tiossemicarbazonas influenciando nas atividades biológicas (TENÓRIO, 2005).

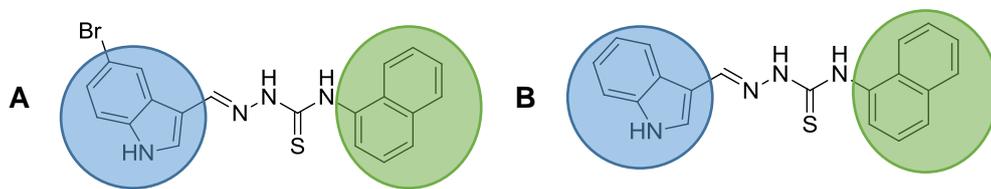


Figura 7 - Derivados indol-tiossemicarbazonas. **A.** LqIT/LT-50 e **B.** LqIT/LT-51.

Tabela 5. Valores de LogP para os derivados indol-tiossemicarbazonas da série LT.

Compostos	Substituintes		LogP
	R ₁	R ₂	
LqIT/LT-50 (1a)	Br		5,25
LqIT/LT-51 (2a)	H		4,42
LqIT/LT-53 (3a)	H		3,91
LqIT/LT-54 (1b)	Br		5,63
LqIT/LT-55 (2b)	H		4,8
LqIT/LT-56 (3b)	Br		5,12
LqIT/LT-57 (4b)	H		4,29
LqIT/LT-58 (4a)	Br		4,6
LqIT/LT-59 (5a)	H		3,77

Dados obtidos através do programa ChemSketch 12.0 Advanced Chemistry Development (ACDLabs/ChemSketch)

O LogP dos derivados indol-tiossemicarbazonas LqIT/LT-51, LqIT/LT-58 e LqIT/LT-55, calculados pelo programa *ChemSketch 12.0 Advanced Chemistry Development*, mostram valores crescentes (4,42 > 4,6 > 4,8 respectivamente), isso mostra, que esses derivados que mais se destacaram nos testes *in vitro* apresentam um caráter mais hidrofílico. Contudo, essa lipofilicidade da molécula pode ter contribuído no *screening* da atividade esquistossomocida.

O derivado LqIT/LT-50 (Figura 8) ainda apresenta o átomo de bromo (vermelho) ligado a porção indólica da molécula. Os halogênios além de contribuírem nos efeitos eletrônicos podem aumentar a lipofilicidade da molécula. Neste caso, este átomo apresenta efeito indutivo negativo, contudo apresenta efeitos mesomérico positivo, além de contribuir com o aumento do grupamento

(efeito estérico) ao qual está inserido, pois o raio atômico do bromo é bem evidente. No entanto, esses efeitos não foram favoráveis na atividade *in vitro* para *S. mansoni*.

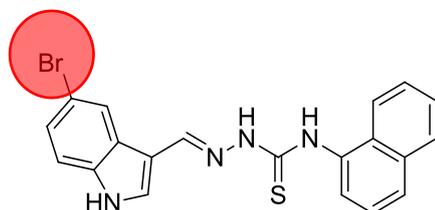


Figura 8 - Derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-50

Observa-se também a presença do grupo naftil (verde) no derivado LqIT/LT-55 (Figura 9), que ao total apresenta 3 grupos bem volumosos (indol, tiazolidinona e naftil) e nenhum substituinte, proporcionando a realização de inúmeras interações hidrofóbicas. Quando comparado com o derivado LqIT/LT-54, que apresenta ainda o átomo de Bromo (vermelho) ligado a grupo indol, encarregado por dois efeitos (efeito indutivo negativo e efeito mesomérico positivo) contribuindo para que esta região possa ser responsável por interações hidrofílicas

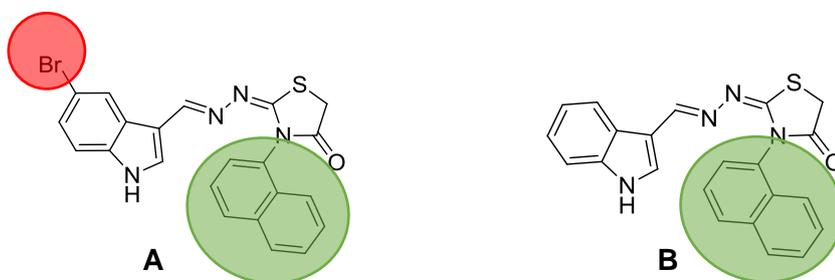


Figura 9 - Derivados indol-tiossemicarbazonas. **A.** LqIT/LT-54 e **B.** LqIT/LT-55

Um outro derivado que se destacou, apresentando modificações estruturais diferentes quando comparados ao LqIT/LT-51 e LqIT/LT-55, é o LqIT/LT-58 (Figura 10) que apresenta um grupo toluil (amarelo) que realiza interações hidrofóbicas (aumentando assim a lipofilicidade da molécula), já o halogênio (vermelho) no grupamento indol tem dois efeitos (efeito indutivo negativo e efeito mesomérico positivo) contribuindo para que esta região possa ser responsável por interações hidrofílicas. Já o LqIT/LT-59, apresenta apenas os grupamentos indol e toluil

evidenciando efeitos do tipo estéricos nas duas regiões, e não contribuiu em bom resultado para os testes *in vitro*.

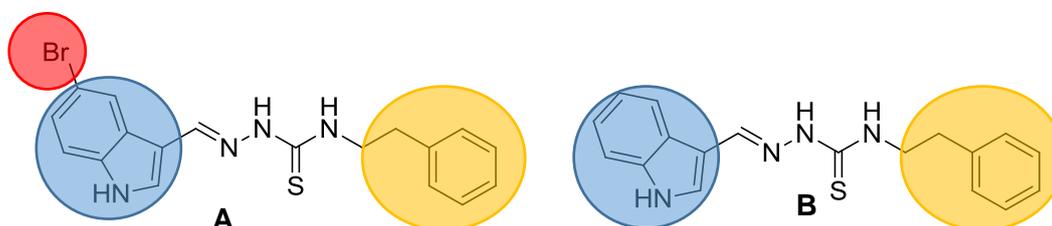


Figura 10 - Derivados indol-tiossemicarbazonas. **A.** LqIT/LT-58 e **B.** LqIT/LT-59

Os derivados LqIT/LT-56 e LqIT/LT-57 (Figura 11) apresentam em seu esqueleto 3 grupos volumosos (indol (azul), tiazolidinona (amarelo) e fenil (roxo)). O átomo de bromo (vermelho) no grupamento indol presente no derivado LqIT/LT-56 permite que ocorram os efeitos mesomérico positivo e indutivo negativo. Já o anel fenílico presente em ambos os derivados, apresenta na posição *para* um substituinte metil (cinza), ele aumenta o logP e contribui com o efeito indutivo positivo. Os derivados apresentam um elevado efeito estérico, sendo assim, bem volumosos, contribuindo para uma baixa atividade esquistossomicida *in vitro*. No entanto, o derivado LqIT/LT-53 (Figura 10), bioisómero do derivado LqIT/LT-56, que não apresenta o anel 4-tiazolidinona e nem o átomo de bromo, foi mais efetivo entre estes derivados nos testes. O LqIT/LT-53 apresenta na posição *para* do anel fenílico, um substituinte metil, que contribui com o efeito indutivo positivo e na lipofilicidade.

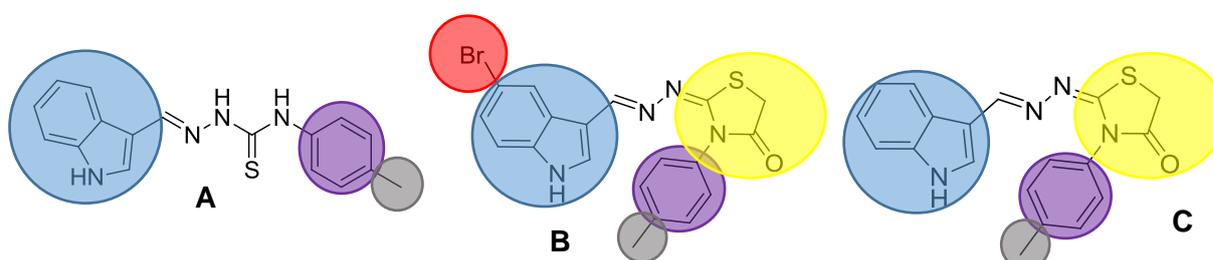


Figura 11 - Derivados indol-tiossemicarbazonas. **A.** LqIT/LT-53, **B.** LqIT/LT-56 e **C.** LqIT/LT-57

A ciclização do sistema NNS da tiossemicarbazona resultando no anel 4-tiazolidinona (Figura 12), modificação bioisostérica não-clássica (MANNHOLD, KUBINYI & FOLKERS, 2012) é uma das técnicas aplicadas ao planejamento de fármacos (KIER & HALL, 2004; BURGER, 1983). No entanto, essa estratégia de

ciclização do sistema NNS gerou uma baixa atividade esquistossomicida. Os derivados LqIT/LT-54, LqIT/LT-55 e LqIT/LT-56 são bioisómeros dos derivados LqIT/LT-50, LqIT/LT-51 e LqIT/LT-53, elas apresentam um anel 4-tiazolidinona resultante da ciclização da tiossemicarbazona.

Com isso, podemos comparar os resultados do *screening in vitro* verificando a porcentagem de mortalidade entre os parasitos adultos de *S. mansoni* (LqIT/LT-54: 56,25% versus LqIT/LT-50: 62,5% com 120 horas; LqIT/LT-55: 100% com 72 horas versus LqIT/LT-51: 100% com 24 horas; LqIT/LT-56: 12,5% versus LqIT/LT-53: 62,5% com 120 horas) evidenciando que a modificação estrutural não foi satisfatória.

De acordo com Moreira e colaboradores (2014) um maior grau de restrição na conformação para o planejamento e síntese de derivados tiossemicarbazonas e *N*-acilhidrazonas reproduzirá novos compostos com uma melhor atividade antiparasitária. No entanto, tal fato não foi evidenciado no nosso estudo.

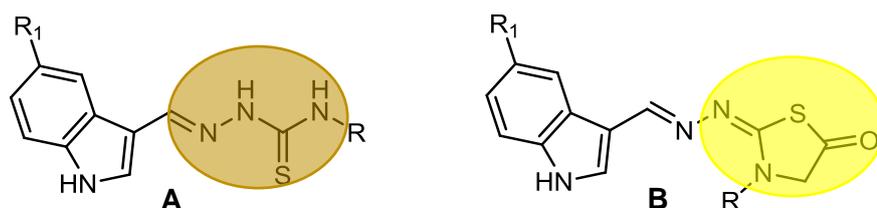


Figura 12 - Ciclização do sistema NNS da tiossemicarbazona (A) no anel 4-tiazolidinona (B).

Santiago e colaboradores (2014) sintetizaram derivados tiossemicarbazonas e tiazóis para avaliar a atividade anti-*Schistosoma in vitro*. Dentre os derivados sintetizados e testados, pode-se perceber a melhor resposta biológica do composto LpQM-45 (Figura 13) que conseguiu causar 100% de mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em 144h nas concentrações de 100 e 80 µg/mL. O mesmo composto foi ativo nas demais concentrações de (60 e 40 µg/mL) causando 90% e 95% de mortalidade, respectivamente.

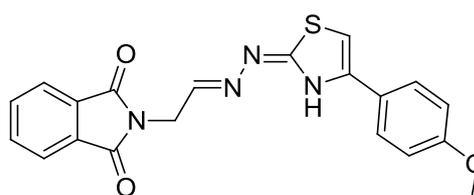


Figura 13 - Estrutura química do composto LpQM-45 (2-(2-(2-(4-(4-metóxi-fenil) tiazol-2-il)hidrazono)etil)isoindol-1,3-diona)

O derivado LpQM-45 apresenta em sua estrutura um grupo isoindol (bioisómero do indol) e o hidrazono-tiazol (bioisómero da tiossemicarbazona), grupos presentes nos nossos estudos e que comprovam a relevância desses grupos corroborando com os resultados analisados.

Após a análise dos derivados testados no *screening*, foram selecionados os mais promissores das séries (LqIT/LT-51, LqIT/LT-55 e LqIT/LT-58), e foram submetidos a exposição com os vermes adultos de *S. mansoni* nas demais concentrações (100, 50 e 25 μM) (Tabela 6). Em ambos os procedimentos, foi observado a motilidade (MANNECK *et al.* 2010), mortalidade, oviposição e as alterações morfológicas do tegumento dos vermes.

Tabela 6: Scores da motilidade de vermes adultos de *S. mansoni* expostos aos derivados indol-tiossemicarbazonas.

Compostos	Tempo (h)	Concentração (μM)															
		200				100				50				25			
		3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
LqIT/LT-51	24	-	-	-	100	-	-	100	-	100	-	-	-	100	-	-	-
	48	-	-	-	100	-	-	-	100	50	50	-	-	83,3	16,6	-	-
	72	-	-	-	100	-	-	-	100	-	41,6	58,3	-	66,6	33,3	-	-
	96	-	-	-	100	-	-	-	100	-	33,3	58,3	-	33,3	50	16,6	-
	120	-	-	-	100	-	-	-	100	-	33,3	66,6	8,33	33,3	50	16,6	-
LqIT/LT-55	24	-	25	41,6	12,5	-	8,33	33,3	58,3	-	25	58,3	16,6	16,6	41,6	41,6	-
	48	-	-	33,3	31,2	-	8,33	25	66,6	-	-	41,6	58,3	-	16,6	58,3	25
	72	-	-	-	100	-	-	33,3	66,6	-	-	-	100	-	8,33	41,6	50
	96	-	-	-	100	-	-	25	75	-	-	-	100	-	-	33,3	66,6
	120	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	33,3	66,6
LqIT/LT-58	24	-	-	33,3	66,6	-	-	33,3	66,6	-	25	75	-	-	83,3	16,6	-
	48	-	-	-	100	-	-	-	100	-	25	16,6	58,3	-	33,3	25	41,6
	72	-	-	-	100	-	-	-	100	-	16,6	25	66,6	-	33,3	25	41,6
	96	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	16,6	83,3	-	25	16,6	58,3
	120	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	16,6	83,3	-	25	16,6	58,3

Conforme ilustrado na Tabela 6, o derivado LqIT/LT-51 exibiu ausência total de seus movimentos (*score* = 0) na concentração de 100 μM em 48 horas. Na concentração de 50 μM houve uma diminuição expressiva dos movimentos dos vermes (*score* = 1) de 66,6%, além do desacasalamento e o aparecimento de bolhas no tegumento.

O composto LqIT/LT-55 foi capaz de paralisar em 100% dos movimentos nos parasitos, considerando-os mortos (*score*=0) nas concentrações de 100 μ M e 50 μ M, no tempo de 120 horas e 72 horas, respectivamente. Na concentração de 25 μ M, o composto foi capaz de reduzir mais da metade dos vermes vivos (*score*=0) no tempo de 120 horas.

O composto LqIT/LT-58 causou a mortalidade de 100% dos vermes de *S. mansoni* em 48 horas na concentração de 100 μ M. No entanto, houve uma grande expressão na porcentagem de vermes mortos (*score*=0) na concentração de 50 μ M com 83,3%.

Durante a completa observação dos vermes no período de 120 horas, aqueles pertencentes ao grupo controle negativo exibiram movimentos corporais e peristálticos normais, ocasionando também na aderência dos mesmos ao fundo da placa de cultura (*score*=3). No entanto, os vermes em contato com o PZQ (controle positivo), apresentaram ausência total de seus movimentos (*score*=0) logo nas primeiras 24h de observação.

Para confirmação destes resultados de viabilidade com vermes adultos de *S. mansoni* após exposição com os derivados indol-tiossemicarbazonas citados anteriormente, foi realizado o teste de MTT (Comley et al., 1989). Nessa perspectiva o derivado de melhor eficácia escolhido, foi o LqIT/LT-51.

Assim, a capacidade de reduzir o MTT para cristais de formazan após a exposição de 24 horas ao derivado LqIT/LT-51 foi significativo ($p < 0.01$) (Figura 14) afetando os vermes nas concentrações de 200 e 100 μ M. Os efeitos de inibição foram comparados com os vermes expostos ao controle positivo (PZQ) e negativo, onde apenas o controle positivo foi significante ($p < 0,1$). Os valores de CC_{50} para o composto LqIT/LT-51 foi de $91,2 \pm 16,9$ e para o CC_{95} $229,0 \pm 42,3$. Isso mostra o poder de inviabilização do LqIT/LT-51 sobre os vermes adultos de *S. mansoni*.

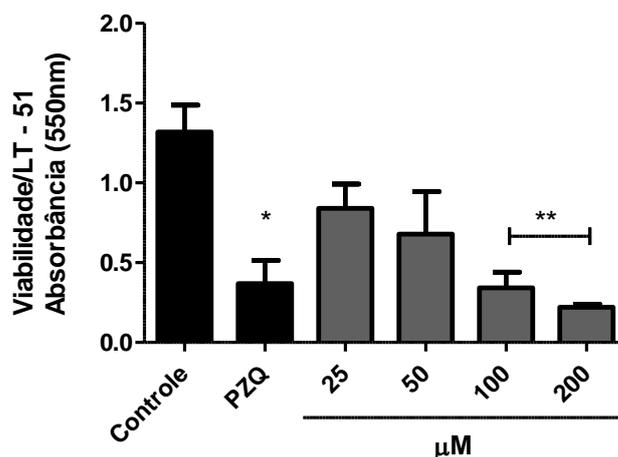


Figura 14 - Gráfico de viabilidade de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com o derivado LqIT/LT-51 após 24h determinado pelo ensaio de MTT em 550 nm (** $p < 0.01$) (* $p < 0.1$).

Aires e colaboradores (2014) sintetizaram e utilizaram a β -lapachona (3,4-dihidro-2,2-dimetil-2H-naftol [1,2-b] piran-5,6-diona) (Figura 15), um derivado naftoquinona, na atividade *in vitro* para *S. mansoni*. Foi verificado que com 24h a β -lapachona, na concentração de 100 μ M, foi capaz de causar 100% da mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. E através do MTT, as concentrações de 25, 50 e 100 μ M, foram capazes de reduzir a formação dos cristais de formazan, de forma significativa, em 17,7%, 27,4% e 54,8% respectivamente, quando comparada com o controle negativo.

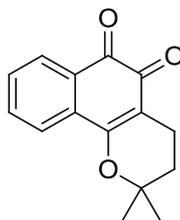


Figura 15 - Estrutura química da β -Lapachona.

Os derivados naftoquinonas que apresenta semelhança estrutural com o anel do grupo naftil presente no derivado testado anteriormente, o LqIT/LT-51. Evidenciando a eficácia de compostos heterocíclicos na atividade esquistossomicida de vermes adultos *in vitro*.

Afim de investigar a capacidade de causar mortalidade em vermes jovens de *S. mansoni*, foram eleitos os derivados indol-tiossemicarbazonas com maior eficácia para vermes adultos (LqIT/LT-51, LqIT/LT-55 e LqIT/LT-58) expondo os vermes com os derivados na concentração de 200 μ M. Assim, os vermes jovens de *S. mansoni* foram expostos no período de até 120h e monitorados a cada 24h, sendo observado

a sua motilidade (Manneck *et al.* 2010), mortalidade, oviposição e as alterações morfológicas do tegumento dos vermes.

Conforme ilustrado na Tabela 7, todos os derivados indol-tiossemicarbazonas foram capazes de causar mortalidade, porém o derivado LqIT/LT-51 demonstrou eficácia com 100% de mortalidade em 48 horas (*score* =0). Além disso, os derivados LqIT/LT-58 e LqIT/LT-55 foram capazes de induzir 100% de mortalidade em 72 horas.

De um modo geral, os parasitos expostos com os derivados indol-tiossemicarbazonas apresentaram musculatura contorcida, presença de bolhas, ausência de ovos, não acasalados e falta de aderência à placa de cultura. Em contrapartida, os parasitos no grupo controle negativo (meio RPMI 1640 e 1,6% de DMSO) apresentaram movimentos corporais e peristálticos normais, ocasionando também na aderência dos mesmos ao fundo da placa de cultura (*score*=3) e aqueles do grupo controle positivo (PZQ) mostraram uma diminuição significativa da motilidade (*score*= 2 e 1), porém não levando 100% de mortalidade.

Tabela 7: Mortalidade de vermes jovens de *S. mansoni* submetidos ao tratamento com os derivados indol-tiossemicarbazonas na concentração inicial de 200 µM.

Compostos	Porcentagem da mortalidade dos vermes (%) após incubação																			
	24h				48h				72h				96h				120h			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
LqIT/LT-51	-	-	16,6	83,3	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
LqIT/LT-58	-	41,7	58,3	-	-	-	66,6	33,3	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100
LqIT/LT-55	-	-	33,3	66,6	-	-	25	75	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100

Nos trabalhos de Kamel e colaboradores (2017) foi testado o fármaco primaquina (8-aminoquinolina) (Figura 16) utilizado como antimalárico, e observaram que a concentração de 20 µg/mL foi capaz de causar 100% de mortalidade em vermes jovens. No entanto, os vermes expostos ao PZQ (5 µg/mL) em 24 horas não foi capaz de causar 100% de mortalidade, apenas ocasionou a diminuição da motilidade, mas em 48 horas foi observada 100% da mortalidade dos parasitos.

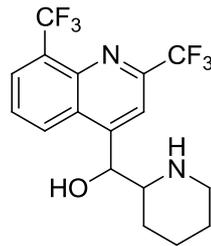


Figura 16 - Estrutura química da Primaquina

Para confirmação destes resultados frente a vermes jovens de *S. mansoni* após exposição com os derivados avaliados, foi realizado o teste de MTT (Comley et al., 1989). Nessa perspectiva o derivado de melhor eficácia escolhido, foi o LqIT/LT-51, compostos já utilizado no teste para vermes adultos.

Assim, a capacidade de reduzir o MTT para cristais de formazan após 24 horas de exposição ao derivado LqIT/LT-51 foi significativo ($P < 0.001$) para as concentrações de 200, 100 e 50 μ M (Figura 17). Os efeitos de inibição foram comparados com os vermes expostos ao controle positivo (PZQ) e negativo, onde nenhum desses apresentaram resultados significativos, no entanto, foi notório a atividade sobre as formas jovens em todas as concentrações testadas. Os valores de CC_{50} para o composto LqIT/LT-51 foi de $81,1 \pm 10,0$ e para o CC_{95} $205,1 \pm 19,3$. Isso mostra o poder de inviabilização do LqIT/LT-51 sobre os vermes jovens de *S. mansoni*.

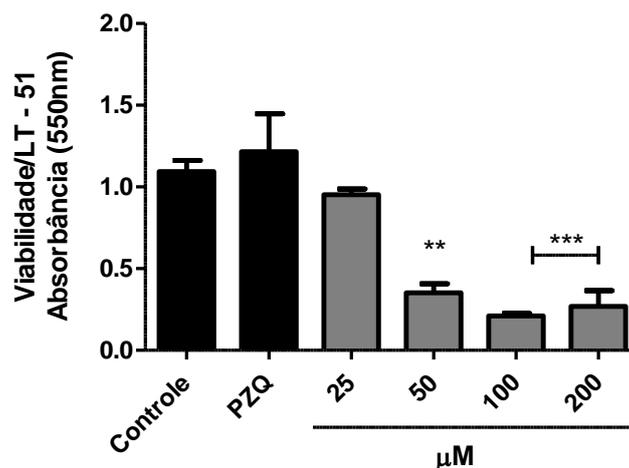


Figura 17 - Gráfico de viabilidade de vermes jovens de *S. mansoni* tratados com o derivado LqIT/LT-51 após 24h determinado pelo ensaio de MTT em 550 nm (*** $p < 0.001$) (** $p < 0.01$).

Os resultados observados mostram como o PZQ não apresenta atividade sobre os vermes jovens para *S. mansoni* (Kamel et al., 2017; PEREIRA et al., 2010),

com isso, podemos afirmar a importância da pesquisa com anéis aromáticos e heterocíclicos (naftil e indol) e as tiossemicarbazonas para a atividade esquistossomocida (COWAN et al, 2015; MOREIRA et al, 2014) em vermes jovens.

4.3 ULTRAESTRUTURA DE VERMES ADULTOS E JOVENS DE *S. mansoni*

Um alvo biológico importante para a descoberta de novos fármacos esquistossomicidas é o tegumento que recobre a superfície dos parasitos, pois a fisiologia da membrana da superfície e a integridade do tegumento são fundamentais para o desenvolvimento desses parasitos de *Schistosoma* (Bertão et al., 2012). Essas estruturas desempenham funções essenciais de imunidade, absorção de nutrientes e metabolismo do colesterol do hospedeiro (Pereira et al., 2015; Bertão et al., 2012). Essas mudanças degenerativas nos tegumentos dos *Schistosomas* devem ser úteis para elucidar o mecanismo de ação dos derivados testados.

Afim de verificar as alterações superficiais e ultraestruturais dos vermes adultos e jovens tratados com o derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51, os vermes foram tratados, cortados e analisados através da microscopia eletrônica.

4.3.1 Alteração do tegumento dos vermes adultos e jovens *in vitro* por microscopia eletrônica de varredura

Através da microscopia eletrônica de varredura é possível analisar toda a área superficial topográfica dos vermes de *S. mansoni*, para verificar o possível mecanismo de ação do derivado LqIT/LT-51 sobre o tegumento e musculatura.

Na Figura 18 (A – F) mostra a superfície topográfica dos vermes adultos fêmea e macho do controle negativo após 24 horas, onde todos os vermes apresentavam-se vivos. No corpo da fêmea são observadas as ventosas oral e ventral com a ausência de tubérculos, espinhos ou papilas sensoriais (Figura 18 A) e fissuras dispostas em paralelo com espinhos (Figura 18 B-C). Os vermes machos exibem uma disposição paralela normal de suas dobras, um corpo longo com o canal ginecóforo normal (Figura 18 D), apresentando tubérculos com algumas projeções (espículos) (Figura 18 E), além de serem observadas as papilas sensoriais (Figura 18 F).

Após tratamento com PZQ (10 μ M), todos os vermes estavam mortos após 24 horas. Foi observado que as superfícies topográficas desses vermes mostram danificadas, o corpo se apresenta na forma de espiral ou contorcido (Figura 18 F), com ulcerações, decorrentes as bolhas estouradas e perda de tubérculos e espinhos (Figura 18 G).

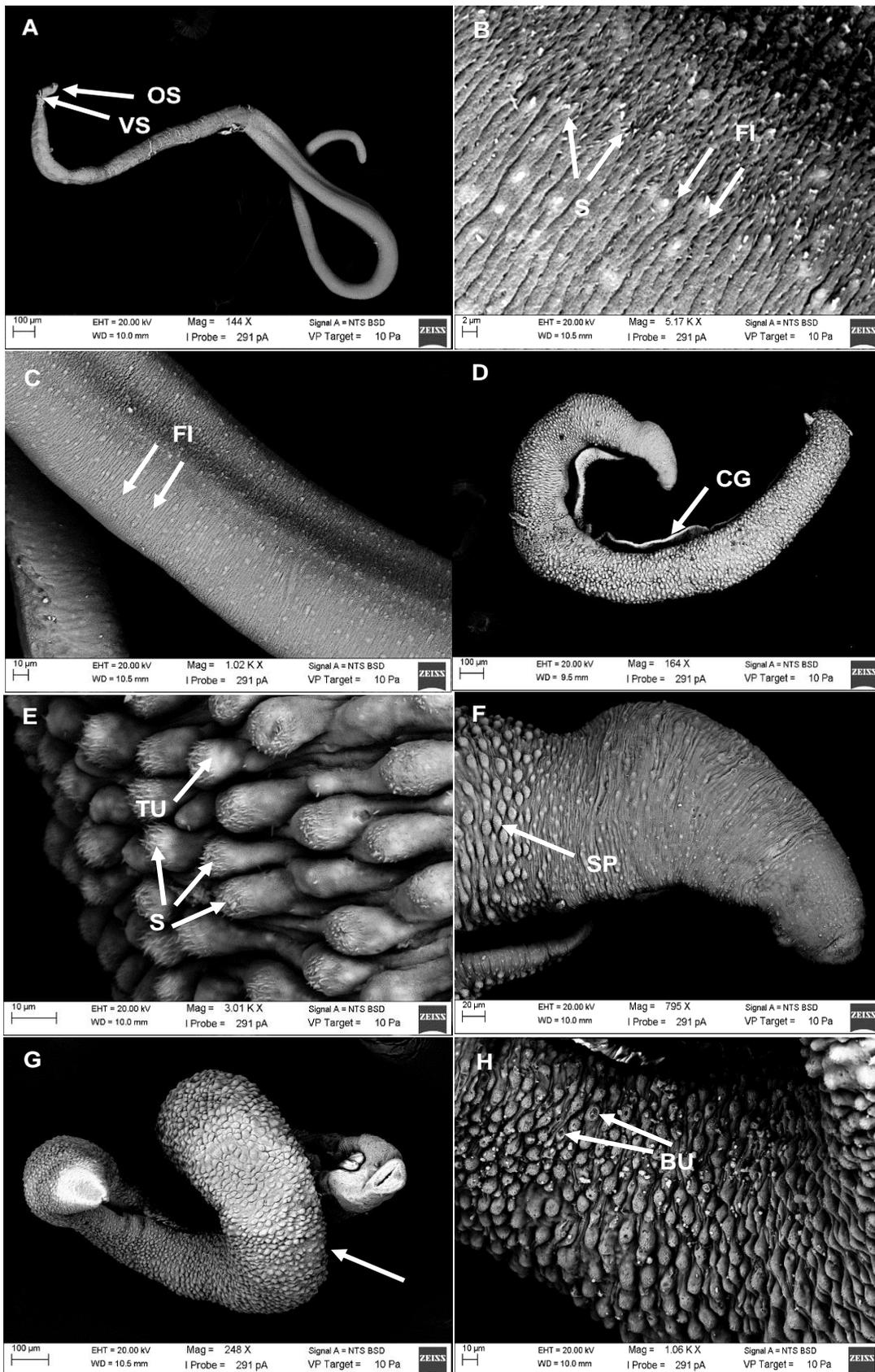


Figura. 18 - (A-E) Imagens de MEV de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* não submetidos a tratamento (meio RPMI + DMSO) após 24 horas de observação. A) Ventosas orais (OS) e ventrais (VS) de vermes fêmea. B-C) Fissuras paralelas (FI) e espinhos (S). D) Canal ginecóforico (CG) de vermes macho apresentando-se sem anormalidades. E) Tubérculos (TU) com espículos (S). F) Papilas sensoriais (SP). (F-G) Imagens de MEV de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* tratados com praziquantel (10 μ M) após 24 horas de observação. F) Verme mostrando um corpo contorcido

(seta). G) Danos graves no tegumento, com o aparecimento de bolhas estouradas (BU) com perda de espículos.

Vários danos ultraestruturais foram observados quando os vermes adultos de *S. mansoni* foram expostos com o composto LqIT/LT-51 (200 μ M), caracterizada por uma extensiva destruição pelo tegumento. Nas vermes fêmeas foram observados a desintegração de parte do tegumento e extensivas erosões por todo o corpo (Figura 19 A-C), além de descamações em algumas áreas (Figura 19 C), não podendo mais evidenciar as fissuras paralelas características das fêmeas decorrente ao inchaço ocasionado pela ação do fármaco. Os danos causados nos vermes machos foram maiores, observa-se uma extensiva destruição por todo o tegumento (Figura 19 D), erosões ou rupturas do tegumento próximas do canal ginecofórico e muitas bolhas (Figura 19 E), com a agressiva destruição do tegumento, foi possível notar a exposição da camada muscular e tecido subcutâneo desses vermes machos (Figura 19 F).

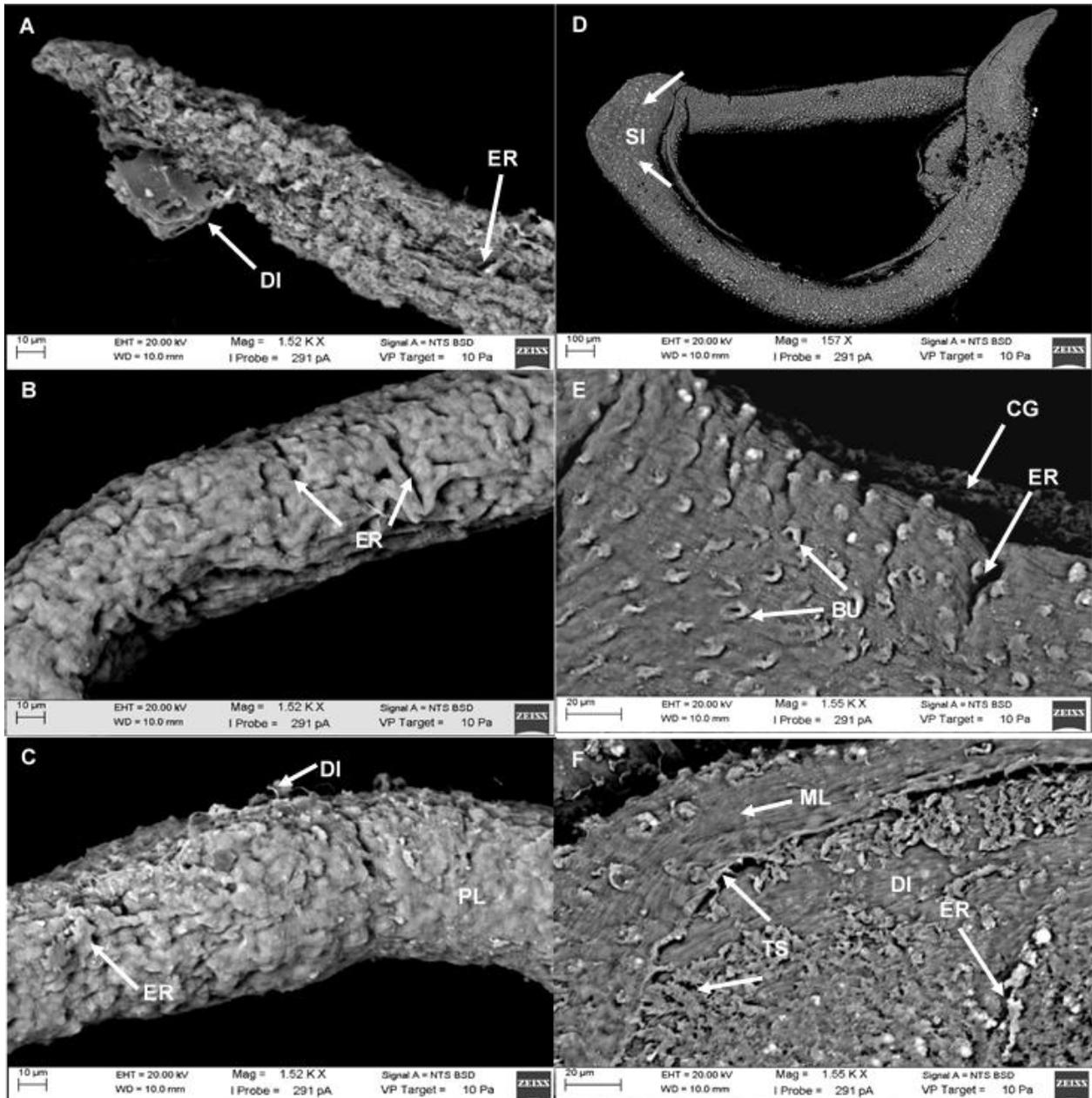


Figura 19 - (A-F) Imagens de MEV de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* submetidos a tratamento com o composto LqIT/LT-51 (200 µM) após 24 horas de observação. (A –C) Vermes fêmeas com extensiva desintegração do tegumento (DI), erosões (ER) e descamações (PL) pelo corpo. (D-F) Vermes machos com extensiva desintegração do tegumento (DI) e erosões (ER), com o aparecimento e bolhas (BU), aparecimento da camada muscular (ML), tecido subcutâneo (TS).

Alterações semelhantes verificadas com o derivado LqIT/LT-51, também ocorreram no teste com outros fármacos (SANTIAGO et al., 2015; AIRES et al., 2014; MANNECK et al., 2010).

Santiago e colaboradores (2015) ao verificarem a ação do composto LpQM-45 (Figura 13) na concentração de 80 µg/mL em 24 horas em parasitos adultos de *S. mansoni*, observaram uma completa destruição de alguns tubérculos, com grande destruição e exposição da camada do tecido muscular em parasitos machos. As fêmeas apresentaram sérios danos, como destruição e desintegração extensivas do tegumento, e exposição e lesão da camada de tecido muscular.

Aires e colaboradores (2014) ao testar a β-lapachona (Figura 15) na concentração 50µM em 18 horas, também pode verificar um inchaço nos vermes machos, decorrente a isso, desprendimento e erosão dos tubérculos, perda de espículas, bolhas e rachaduras.

O inchaço do tegumento encontrado nas vermes fêmeas avaliadas neste estudo foi também descrito por Manneck et al., 2010, quando eles avaliaram a mefloquina ([2,8-bis(trifluorometil)quinolin-4-il]-piperidin-2-il-metanol) (Figura 20), fármaco utilizado no tratamento da malária, na concentração de 10 µg/mL em 24 horas. O inchaço do tegumento foi observado em todas as fêmeas do estudo. Ainda foram observadas numerosas bolhas, perda de espinhos, fissuras e poros.

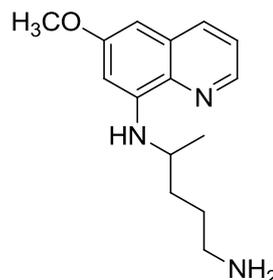


Figura 20 - Estrutura química da Mefloquina

Para a análise dos vermes jovens, foi observado inicialmente o controle negativo, que após 24 horas (Figura 21 A-C), onde todos os vermes se encontraram vivos, eles apresentam uma superfície topográfica íntegra, sendo possível observar a ventosa ventral, o início do canal ginecóforo (Figura 21 A-B) e apresentando tubérculos em desenvolvimento com algumas projeções (espículas) (Figura 21 C).

Os vermes jovens tratados com PZQ (10 µM) na figura 21 (D-E), onde parte deles apresentaram uma baixa motilidade, as alterações morfológicas foram

demonstradas com uma leve contração do corpo (Figura 21 D), com o aparecimento de algumas bolhas e rugas tegumentais (Figura 21 E).

Danos ultraestruturais em vermes jovens tratados com o composto LqIT/LT-51 (200 μ M) foram observados em todo o corpo. É possível verificar uma extensa destruição e modificações do tegumento (Figura 21 F), descamações e rugas tegumentais (Figura 21 G), além de desintegração por parte do tegumento e fortes erosões (Figura 21 H).

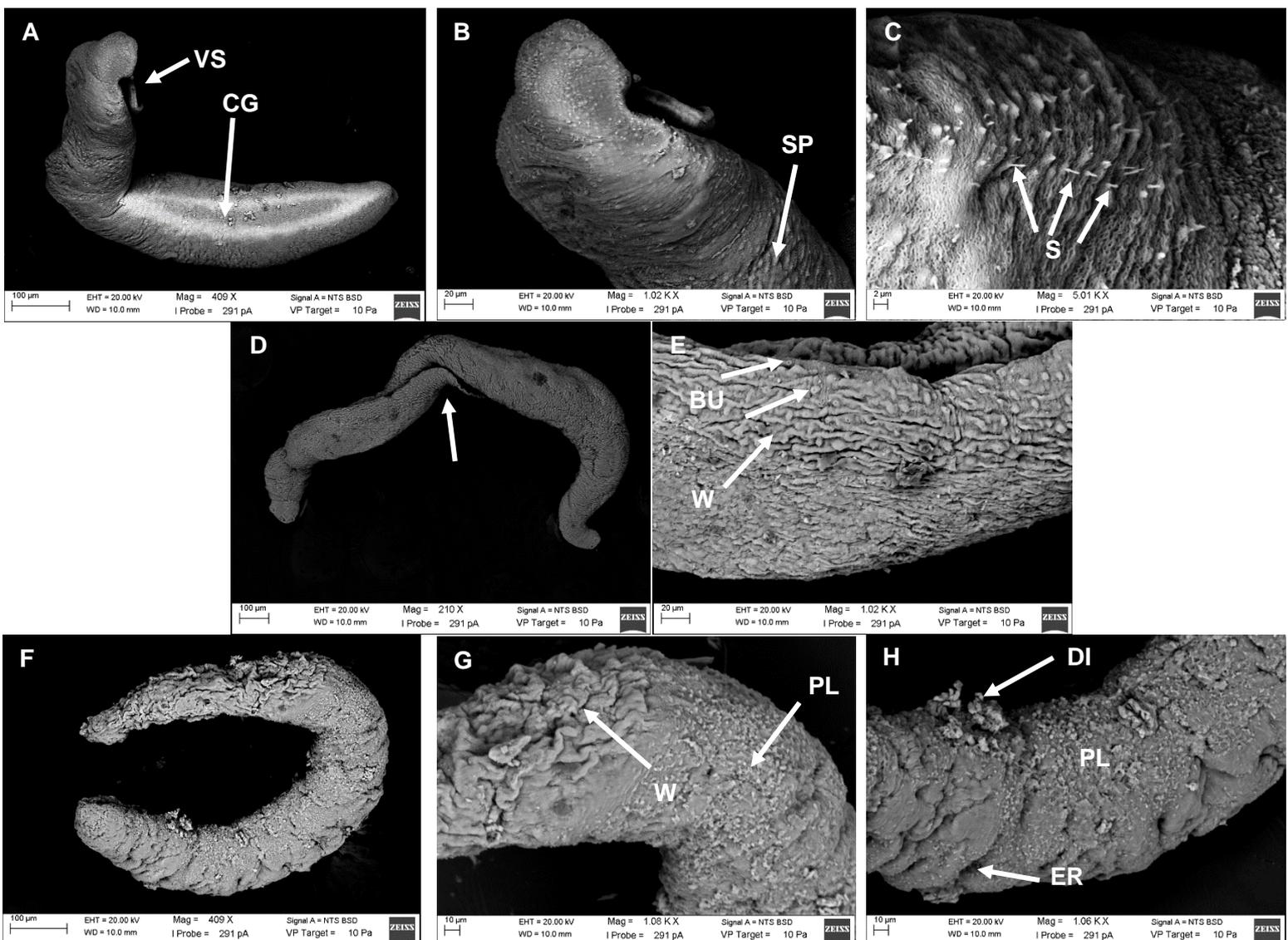


Figura 21 - (A-C) Imagens de MEV de vermes jovens de *Schistosoma mansoni* não submetidos a tratamento (meio RPMI + DMSO) após 24 horas de observação. A) Ventosa ventral (VS) e início do canal ginecóforico (CG). B) Espículas (SP). C) Espinhos (S). (D-E) Imagens de MEV de vermes jovens de *Schistosoma mansoni* tratados com praziquantel (10 µM) após 24 horas de observação. D) Contração do corpo (seta). E) Danos no tegumento, com o aparecimento de bolhas (BU) e rugas tegumentais (W). (F-H) Imagens de MEV de vermes jovens de *Schistosoma mansoni* submetidos a tratamento com o composto LqIT/LT-51 (200 µM) após 24 horas de observação. F) Extensa destruição no tegumento. G) Aparecimento de rugas tegumentares (W) e descamações pelo corpo (PL). H) Desintegração de parte do tegumento em alguns pontos (DI), fortes erosões (ER) e muitas descamação (PL).

Alterações semelhantes verificadas com o derivado LqIT/LT-51, também ocorreram no teste com outros fármacos (KAMEL et al, 2017). Kamel e colaboradores (2017) utilizaram a primaquina (Figura 16), fármaco antimalárico, nas concentrações de 10, 15 e 20 µg/mL e após 24 horas observaram no geral descamações na superfície ventral, dobra dorsal, erosões e rugas. O PZQ (controle positivo) (5 µg/mL) mesmo não apresentando 100% de eficácia em 24 horas, causando apenas diminuição da motilidade, também mostrou efeitos sobre o tegumento desses vermes, como contração, vesículas e bolhas na região anterior.

4.4 CAPACIDADE DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA GENÔMICO DE *S. mansoni* TRATADO COM O DERIVADO INDOL-TIOSSEMICARBAZONA LQIT/LT-51

Moléculas pequenas na qual se ligam ao DNA alterando ou inibindo o seu funcionamento, o torna um alvo terapêutico para vários fármacos em uso clínico ou que estão em ensaios clínicos avançados (SIRAJUDDIN, ALI e BADSHAH, 2013).

4.4.1 Eletroforese

A fragmentação natural do DNA geralmente ocorre durante a programação da morte celular, sendo assim, caracterizada pela apoptose (MINUTOLO et al., 2005). Este teste é um dos mais confiáveis para distinguir apoptose e necrose. Na 1ª pista foi adicionado o DNA Ladder, na 2ª pista o DNA dos vermes adultos de *S. mansoni* não tratados (controle negativo), na 3ª pista o DNA dos vermes adultos de *S.*

mansoni tratados com o derivado LqIT/LT-51 na concentração de 200 μM e na 4^o pista a ciclofosfamida (controle positivo), como visto na Figura 22.

A imagem foi tirada com a ajuda Fotodocumentador para gel de eletroforese – L-PIX TOUCH (Loccus) através do software L-Pix Image. A figura 22 mostra claramente a formação da banda de DNA na 3^o pista (DNA de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com o LQIT/LT-51), que indica que ocorreu a quebra ou fragmentação do DNA, isso só pode acontecer quando ocorre apoptose celular.

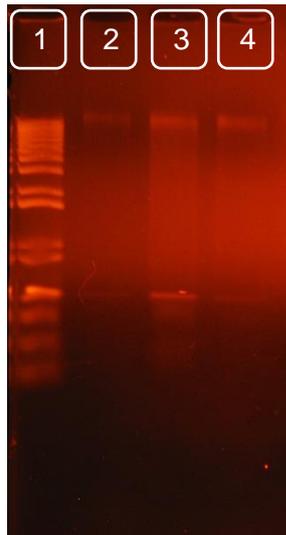


Figura 22 - Formação da fragmentação do DNA de vermes adultos de *S. mansoni* através do gel de agarose. Pista 1: DNA Ladder, Pista 2: DNA de vermes adultos de *S. mansoni* não tratados (Controle negativo), Pista 3: DNA de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com o derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 (200 μM), Pista 4: Ciclofosfamida.

Essa interação com o DNA já pode ser observada nos trabalhos de Oliveira e colaboradores (2017) utilizando os mesmos derivados indol-tiossemicarbazonas deste estudo analisando a interação com ctDNA, monitorada através de espectrofotometria de absorção UV-Visível. A interação entre o ctDNA e o LqIT/LT-51 gerou uma absorbância máxima (334 nm), além de um efeito hipercrômico (aumento da absorbância) proporcional ao aumento da concentração do ctDNA nas amostras. Isso pode confirmar a interação do derivado LqIT/LT-51 com o DNA.

Altintop e colaboradores (2016) sintetizaram derivados tiossemicarbazonas à base de naftalenos e verificaram que através do ensaio do MTT, o composto em estudo (Figura 23) foi capaz de diminuir a viabilidade celular por mais de 50% e para comprovar esse fato, o ensaio de citometria de fluxo posteriormente realizado pode

revelar o efeito apoptótico dose-dependente em 24 horas do composto 4-(naftalen-1-il)-1-(2,4-difluorobenzilideno)-tiossemicarbazida quando comparado com o grupo controle. Isso pode ser um indício para comprovar a eficiência dos derivados tiossemicarbazonas na fragmentação do DNA, identificando a sua indução para a apoptose.

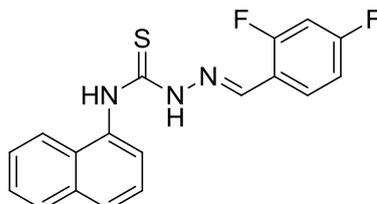


Figura 23 - Estrutura química do composto 4-(naftalen-1-il)-1-(2,4-difluorobenzilideno)-tiossemicarbazida

Na literatura, as pesquisas de fármacos que interagem com o DNA mostram que essa maior afinidade da ligação com o ctDNA é causado pela influência dos grupos doadores de hidrogênio (ALMEIDA et al., 2015; BENNER et al., 2014). O esqueleto do composto LqIT/LT-51 (Figura 6) apresenta um sistema NNS (grupo doador de ligações de hidrogênio), isso também pode ser um dos fatores que influenciaram na interação com o alvo biológico (PAPE et al., 2016).

Pakravan e Masoudian (2015) sintetizaram o composto isatin- β -tiossemicarbazona (IBT) (Figura 24) que apresentou propriedades de ligação com o DNA baseado em experimentos de fluorescência e ensaio de competição com Brometo de etídio e o vermelho neutro. Outros trabalhos como os de Hassan e Ralf (2016), Almeida e colaboradores (2015) e Benner e colaboradores (2014) também relatam essa atividade com o DNA.

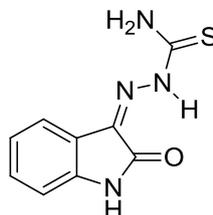


Figura 24 - Estrutura química da isatin- β -tiossemicarbazona (IBT)

No derivado LqIT/LT-51, além do sistema NNS presente no centro da molécula, podemos observar nas suas extremidades os grupos naftil e o grupo indol. Eles são estruturas planares, que de acordo com Rescifina (2014) e Pakravan e

Masoudian (2015), confirmam a importância da planaridade de anéis aromáticos para o aumento da afinidade com o DNA e como potentes indutores da apoptose (MINUTOLO et al., 2005; JIANG et al., 2008; RAO, 2013; ALTINTOP et al., 2016)

Sarkar, Bhattacharjee e Bhadra (2016) testaram o alcalóide Harmalol (Figura 25), um derivado beta carbolina-indol, através de técnicas como a fragmentação do DNA a partir da eletroforese que pode mostrar a sua capacidade de fragmentação e conseqüentemente, na ativação do processo de apoptose do DNA de células HepG2.

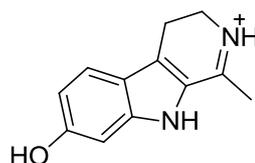


Figura 25 - Estrutura química do alcalóide Harmalol

Almeida e colaboradores (2015) relata em seus estudos que o acoplamento entre o anel acridínico e a porção da tiossemicarbazona (Figura 26) foi o influenciador para promissora ligação com o DNA. Comprovando assim, a importância da tiossemicarbazona na fragmentação do DNA.

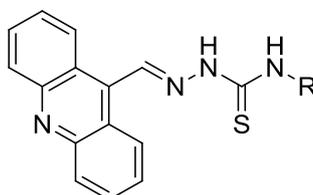


Figura 26 - Esqueleto dos derivados tiossemicarbazonas utilizados nos estudos de Almeida e colaboradores (2015).

Os estudos apresentados acima comparados com os nossos resultados para verificação da fragmentação do DNA genômico de *S. mansoni* sugerem a ação deste derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 sobre um alvo biológico, o DNA.

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *IN VIVO*

4.5.1 Toxicidade aguda do derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51

Diante dos resultados promissores apresentados nos diversos ensaios *in vitro* observados neste estudo, o LqIT/LT-51 foi selecionado para o prosseguimento dos estudos *in vivo*. Nesse sentido, o ensaio de toxicidade aguda se faz extremamente necessário para avaliar o perfil de toxicidade de novos compostos em modelos animais, bem como traçar concentrações atóxicas para estudos posteriores em animais.

No ensaio de toxicidade aguda realizado com o derivado LqIT/LT-51 foi verificado ausência de sinais de toxicidade na dosagem testada (2000 $\mu\text{mol/Kg}$) durante as quatro primeiras horas de avaliação, onde também não foi verificada morte de nenhum dos animais. Após 14 dias de experimento, os animais foram pesados, onde foi observado que nenhum dos grupos experimentais exibiu perda de $\pm 20\%$ do peso corporal.

Não ocorreram alterações de comportamento ou sintomas relacionados ao sistema central nervoso, autonômico, circulatório e/ou respiratório durante o período de avaliação (Tabela 8).

Tabela 8. Sinais de toxicidade aguda e mortalidade do derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 na dose de 2000 $\mu\text{mol/Kg}$.

Parâmetros observados	Observações		
	2000 $\mu\text{mol/Kg}$		
	Tempo		
	4h (1º dia)	7º dia	14º dia
Pele	S. M.	S. M.	S. M.
Olhos e membranas da mucosa	S. M.	S. M.	S. M.
Sinais cardíacos / respiratórios	S. M.	S. M.	S. M.
Padrão de comportamento	S. M.	S. M.	S. M.
Atividade motora	S. M.	S. M.	S. M.
Salivação	N. O.	N. O.	N. O.
Tremores	N. O.	N. O.	N. O.
Convulsões	N. O.	N. O.	N. O.
Letargia	N. O.	N. O.	N. O.
Dormir	N. O.	N. O.	N. O.
Coma	N. O.	N. O.	N. O.
Mortalidade	N. O.	N. O.	N. O.
Necropsia	-	-	S. M.*

S.M.: Sem Mudança, N.O.: Não observado, * sem mudança macroscópica.

4.5.2 Determinação da efetividade do tratamento com o derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51

O derivado LqIT/LT-51 na dose de 50 $\mu\text{mol/Kg}$ apresentou eficácia significativa no tratamento da esquistossomose mansônica em camundongos, reduzindo o número de vermes adultos após o tratamento em 66,6%%, sendo 72,72% representado por vermes fêmeas. As demais doses não apresentaram resultados significativos. O PZQ, por sua vez, teve eficácia de 100% na dose testada (50 $\mu\text{mol/Kg}$) (Tabela 9).

Tabela 9. Eficácia do tratamento de camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados com o derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 e PZQ.

Grupos	Carga média de vermes			Eficácia total (%)
	Fêmeas	Eficácia (%)	Total	
LT-51 50 µmol/Kg	12	72,72%	20	66,6%
LT-51 100 µmol/Kg	46	0%	55	8,33%
LT-51 200 µmol/Kg	57	0%	78	0%
PZQ 50 µmol/Kg	0	100%	0	100%
Controle Negativo	44	-	60	-

O resultado de 66,6% de redução de vermes totais é indicativo de uma atividade esquistossomicida moderada, sendo uma atividade esquistossomicida considerada alta quando o composto testado apresentar uma taxa de mortalidade acima de 80% (Nwaka e Husdon, 2006). No entanto, a expressiva diminuição de vermes adultos fêmeas em nossos estudos foi muito importante, sendo um indicativo dos vermes totais como alvo biológico do derivado LqIT/LT-51.

Testes *in vivo* realizados com a mefloquina (Figura 18) (50, 100 e 200 mg/kg) em camundongos infectados por *S. mansoni* evidenciaram uma redução total de vermes adultos de 44,1%, 64% e 93,4%, respectivamente, evidenciando uma atividade dose-dependente (Keiser et al., 2009). Aires e colaboradores (2014) avaliaram a β -lapachona (Figura 12) (50 mg/kg) em vários estágios de desenvolvimento do *S. mansoni*, para a forma de vermes adultos (45 dias após infecção) ocorreu uma redução de 40,22%. O tratamento *in vivo* utilizando o (-)-6,6'-dinitrohinokinina (DNK) (Figura 27) diminuiu consideravelmente o número total de vermes em 39,9; 48,9 e 48,3% nas concentrações de 10, 50 e 100 mg/kg, respectivamente, não ocorrendo uma atividade dose-dependente (Pereira et al., 2015).

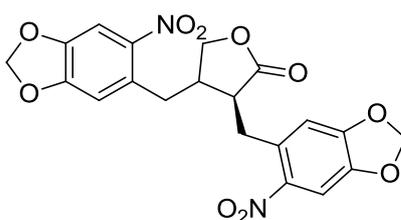


Figura 27 - Estrutura química do DNK ((-)-6,6'-dinitrohinokinina)

Nossos estudos *in vivo* evidenciaram resultados apenas na concentração de 50 $\mu\text{mol/Kg}$, não ocorrendo uma atividade dose-dependente, com isso, pode-se apontar problemas de farmacocinética, levando a diminuição da biodisponibilidade, duração da atuação muito baixa ou longa ou a presença de metabólitos ativos ou inativos (MASIMIREMBWA et al., 2003; PEREIRA et al., 2007). Portanto, estudos farmacocinéticos, medição de concentrações dos fármacos no corpo e nos órgãos alvo, podem ajudar nas respostas dos testes *in vivo*.

4.5.3 Oograma

Pode ser observado, após os respectivos tratamentos, que o derivado LT-51 nas doses de 50 e 200 $\mu\text{mol/Kg}$, assim como o PZQ (50 $\mu\text{mol/Kg}$), foram capazes de interferir nos estádios de maturação dos ovos de *S. mansoni*, quando comparados ao controle negativo (salina). O LT-51 (50 $\mu\text{mol/Kg}$) foi capaz de aumentar em 60,59% a quantidade de ovos maduros, ao passo que suprimiu em 96,67% o quantitativo de ovos inviáveis. A dose de 200 $\mu\text{mol/Kg}$, por sua vez, interferiu apenas na quantidade de ovos inviáveis, onde foi possível observar uma diminuição de 62,02% nesse estágio de maturação (Figura 28) (Tabela 10).

O controle positivo utilizado neste estudo, o PZQ (50 $\mu\text{mol/Kg}$), foi capaz de aumentar o quantitativo de ovos inviáveis em 36,02%. A dose de 100 $\mu\text{mol/Kg}$ também foi capaz de promover alteração nos estádios de desenvolvimento dos ovos de *S. mansoni*, no entanto, os resultados não apresentaram significância estatística.

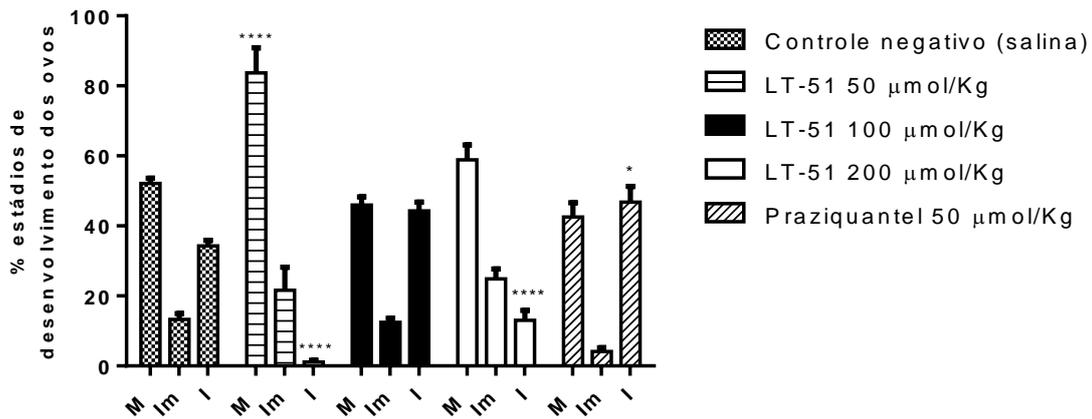


Figura 28 - Efeitos do derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 e PZQ sobre os estádios de maturação dos ovos de *S. mansoni*. M: ovos maduros, Im: ovos imaturos e I: ovos inviáveis. Os dados foram expressos como média \pm EPM de 6 animais por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando * $p < 0.05$ e **** $p < 0.0001$, determinados pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Dunnett's.

Tabela 10. Efeito do derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 sobre os estádios de maturação dos ovos de *S. mansoni*.

Estádio dos ovos	Controle Negativo	LT-51 50 µmol/Kg	LT-51 100 µmol/Kg	LT-51 200 µmol/Kg	PZQ 50 µmol/Kg
Maduros	52,10 \pm 1,52	83,67 \pm 7,21 ****	45,95 \pm 2,36	58,90 \pm 4,19	42,56 \pm 4,02
Imaturos	13,32 \pm 1,60	21,65 \pm 6,55	12,43 \pm 1,19	24,86 \pm 2,80	4,14 \pm 1,10
Inviáveis	34,29 \pm 1,55	1,14 \pm 0,47 ****	44,29 \pm 2,47	13,02 \pm 2,88 ****	46,75 \pm 4,52 *

Os dados foram expressos como média \pm EPM de 6 animais por grupo. Os resultados foram considerados significativos quando * $p < 0.05$ e **** $p < 0.0001$, determinados pela análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste de Dunnett's.

Foi verificado nos trabalhos de Eissa e colaboradores (2017) que utilizaram a Clorambucil (Figura 29) (2,5 mg/kg), um medicamento anti-neoplásico, e verificaram no oograma realizado dos camundongos infectados por *S. mansoni* que a porcentagem de ovos maduros aumento em 53,29% quando comparado ao controle

não tratado, uma diminuição de ovos imaturos em 30% e um leve aumento de ovos inviáveis em 6,13%. Essas alterações significativas no padrão do oograma, redução de ovos imaturos e inviáveis, mostram a eficácia deste fármaco anti-neoplásico na atividade esquistossomicida. Essas alterações no padrão do oograma também foram observadas em nossos estudos com o derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51.

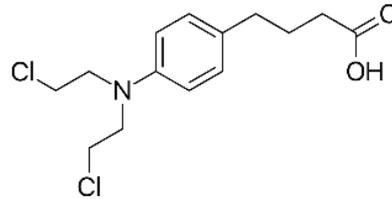


Figura 29 - Estrutura química do Clorambucil

Os ovos maduros de *S. mansoni* permanecem viáveis no intestino por aproximadamente 12 dias, assim, se ocorrer uma baixa na oviposição decorrente a administração do fármaco, a resposta *in vivo* deste fármaco durante o tratamento será no aumento da quantidade de ovos maduros e diminuição ou ausência de ovos em estágio imaturo (FREZZA et al., 2007). Assim, pode-se inferir a ação do derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 sobre a oviposição dos vermes de *S. mansoni*.

5 CONCLUSÕES

- ✓ O derivado LqIT/LT-51 foi o mais promissor da atividade *in vitro* para vermes jovens e adultos de *S. mansoni*. A formação do anel tiazolidinônico não favoreceu a atividade esquistosomicida, no entanto, a adição dos grupos naftil e indol ao sistema NNS se mostrou mais efetivo;
- ✓ O composto LqIT/LT-51 mostrou-se capaz de alterar ultraestruturalmente o tegumento dos vermes adultos e jovens de *S. mansoni*, podendo ser apontado como um mecanismo de ação deste composto;
- ✓ O LqIT/LT-51 foi capaz de fragmentar o DNA genômico de vermes adultos de *S. mansoni*, caracterizando um processo de morte celular por apoptose. A estrutura do LqIT/LT-51 apresenta estruturas planares (grupo naftil e o grupo indol) e o sistema NNS que podem ser influenciadores na interação com o DNA, dessa forma, sugerindo o DNA como um alvo biológico;
- ✓ Na avaliação da toxicidade aguda, o composto LqIT/LT-51 não se mostrou tóxico diante dos parâmetros observados e macroscopicamente;
- ✓ Na concentração de 50 $\mu\text{mol/Kg}$, o LqIT/LT-51 apresentou uma eficácia de 72,72% na redução de vermes fêmeas e 66,6% de vermes totais, um indicativo de atividade esquistosomicida moderada e considerar as vermes fêmeas como possível alvo biológico;
- ✓ A quantificação de ovos de *S. mansoni* avaliados pelo oograma mostrou que o derivado indol-tiossemicarbazona LqIT/LT-51 foi capaz de aumentar significativamente o número de ovos maduros e suprimiu o quantitativo de ovos inviáveis. Assim, podemos sugerir a sua interferência na oviposição dos vermes fêmeas de *S. mansoni*.

6 PERSPECTIVAS

- ✓ Analisar as imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) dos parasitas e identificar os possíveis alvos do parasito tratados com LqIT/LT-51;
- ✓ Analisar o Cheever dos camundongos tratados com LqIT/LT-51 no teste *in vivo* para verificar a sua interferência no número de ovos de *S. mansoni*;
- ✓ Realizar um estudo para o incremento de solubilidade dos derivados indol-tiossemicarbazonas promissores (LqIT/LT-51, LqIT/LT-55 e LqIT/LT-58);
- ✓ Dosar a produção de ânion superóxido através de ensaio colorimétrico do NBT;
- ✓ Avaliar a genotoxicidade e citotoxicidade *in vivo* através do ensaio do micronúcleo.

REFERÊNCIAS

- ABDI, Y. A., GUSTAFSSON, L. L., ERICSSON, O., HELLGREN, U. **Handbook of Drugs for Tropical Parasitic Infections - Second Edition**. Taylor & Francis Ltd, 4 John St, London WC1N 2ET. 2003
- ABDULLA M. H. et al. Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. *PLoS Medicine*, v. 4, p. XX, 2007.
- ACADEMIA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS. **Doenças negligenciadas. Ciência e tecnologia para o desenvolvimento nacional**. Estudos estratégicos – 56 p. .il. Rio de Janeiro, 2010.
- AIRES, A. L.; XIMENES, E. C. P. A.; BARBOSA, V. X.; GÓES, A. J. S.; VALDÊNIA MARIA OLIVEIRA SOUZA, V. M. O.; ALBUQUERQUE, M. C. P. A. **β -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice**. *Phytomedicine* 21 (2014) 261–267
- ALIROL, E. et al. **Nifurtimox-eflornithine combination therapy for secondstage gambiense human African trypanosomiasis: Médecins Sans Frontières experience in the Democratic Republic of the Congo**. *Clin. Infect. Dis.* 56, 195–203, 2013
- ALENCAR, A. C. M. B.; SANTOS, T. S.; NEVES, R. H.; TORRES, E. J. S.; NOGUEIRA-NETO, J. F.; MACHADO-SILVA, J. R. **Simvastatin and artesunate impact the structural organization of adult Schistosoma mansoni in hypercholesterolemic mice**. *Experimental Parasitology* 167, 115e123, 2016.
- ALMEIDA, S.M.V.; LAFAYETTE, E.A.; GOMES DA SILVA, L.P.B.; AMORIM, C.A.C.; OLIVEIRA, T.B.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; MOURA, R.O.; BELTRÃO, E.I.C.; LIMA, M.C.A.; CARVALHO JÚNIOR, L.B. **Synthesis, DNA binding, and Antiproliferative activity of novel acridine-thiosemicarbazone derivatives**. *International Journal of Molecules Sciences*, v. 16, p. 13023-13042, 2015.
- ALMEIDA, M. M. **Efeito da quimioterapia com praziquantel no perfil de citocinas de indivíduos infectados pelo S. mansoni portadores de fibrose periportal**. 78f. (Mestrado em Ciências Biológicas: Imunopatologia das doenças infecciosas e parasitárias) – Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares. 2009.
- ALTINTOP, M. D.; SEVER, B.; ÖZDEMİR, A.; KUŞ, G.; OZTOPCU-VATAN, P.; KABADERE, S.; KAPLANCIKL, Z. A. **Synthesis and evaluation of naphthalene-based thiosemicarbazone derivatives as new anticancer agents against LNCaP prostate cancer cells**. *Enzyme Inhib Med Chem*, 31(3): 410–416, 2016.
- ANDREWS, K.T. et al. **Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases**. *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 4, 95–111, 2014

BANDINI, M. **Electrophilicity: the “dark-side” of indole chemistry.** *Org. Biomol. Chem.* 11, 5206e5212, 2013.

BARREIRO, E. J., MANSOUR, C. A. **Química medicinal: as bases moleculares da ação dos fármacos.** 3ª edição, Artmed. 2015.

BARREIRO, E. J. **A Química Medicinal e o paradigma do composto protótipo.** *Rev. Virtual Quim*, 1 (1), 26-34 p. 2009.

BENNER, K.; IHMELS, H.; KOLSCH, S.; PITHAN, P.M. **Targeting abasic site-containing DNA with annelated quinolizium derivatives: the influence of size, shape and substituents.** *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 12, p. 1725-1734, 2014.

BERTÃO HG, DA SILVA RA, PADILHA RJ, DE AZEVEDO ALBUQUERQUE MC, RÂDIS-BAPTISTA G. **Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult Schistosoma mansoni BH strain worms.** *Parasitol. Res.* 110:2465–2473, 2012.

BRASIL. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** 6ª edição. Ministério da Saúde, Brasília, 2005.

BRITTA, EA; SCARIOT, DB; FALZIROLLI, H; UEDA-NAKAMURA, T; SILVA, CC; FILHO, BP; BORSALI, R; NAKAMURA, CV. **Cell death and ultrastructural alterations in Leishmania amazonensis caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene.** *BMC Microbiology*, v. 14. doi: 10.1186/s12866-014-0236-0. 2014.

BURGER, A. A. **Guide to the Chemical Basis of Drug Design**, NY, EUA,. Wiley, 24-29 p. 1983

CAFFREY, C. R. **Schistosomiasis and its treatment.** *Future Med. Chem.* 7(6), 675–676. 2015

CARDOSO, M.V.O; SIQUEIRA, LRP; SILVA, EB; COSTA, LB; HERNANDES, MZ; RABELLO, MM; FERREIRA, RS; CRUZ, LR; MOREIRA, DRM; PEREIRA, VRA; CASTRO, MCAB; BERNHARDT, PV; LEITE, ACL. **2-Pyridyl thiazoles as novel anti-Trypanosoma cruzi agents: Structural design, synthesis and pharmacological evaluation.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 86, p. 48-59, 2014.

CHADHA, N.; SILAKARI, O. **Indoles as therapeutics of interest in medicinal chemistry: Bird's eye view.** *European Journal of Medicinal Chemistry* 134, 159e184, 2017.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. **Antischistosomal Drugs: Past, Present And Future.** *Pharmac. Ther.* Vol.68.No.I. DD. 35-85.1995.

CONGIU, C.; ONNIS, V. **Synthesis and biological evaluation of novel acylhydrazone derivatives as potential antitumor agents**, *Bioorganic of Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 6592-6599, 2013.

COSTA LB, CARDOSO MV, DE OLIVEIRA FILHO GB, DE MORAES GOMES PA, ESPÍNDOLA JW, DE JESUS SILVA TG, TORRES PH, SILVA JUNIOR FP, MARTIN J, DE FIGUEIREDO RC, LEITE AC. **Compound profiling and 3D-QSAR studies of hydrazone derivatives with activity against intracellular Trypanosoma cruzi**. *Bioorg Med Chem*. 15;24(8):1608-18, 2016

COWAN N. *et al.* **Elucidation of the in vitro and in vivo activities of bridged 1,2,4-trioxolanes, bridged 1,2,4,5-tetraoxanes, tricyclic monoperoxides, silyl peroxides, and hydroxylamine derivatives against Schistosoma mansoni**. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23, 5175–5181, 2015.

CUPIT, P. M.; CUNNINGHAM, C. **What is the mechanism of action of praziquantel and how might resistance strike?** *Future Med. Chem.*7(6), 701–705, 2015.

DA SILVA, E. B.; OLIVEIRA E SILVA, D. A.; OLIVEIRA, A. R.; DA SILVA MENDES, C. H.; DOS SANTOS, T. H. R.; DA SILVA, A. C.; DE CASTRO, M. C. C.; FERREIRA, R. S.; MOREIRA, D. R. M.; DE OLIVEIRA CARDOSO, M. V; DE SIMONE, C. A.; PEREIRA, V. R. A.; LEITE, A. C. L. **Desing and synthesis of potent anti-Trypanosoma cruzi agents new thiazoles derivatives which induce apoptotic parasite death**. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 130, p. 39-50, 2017.

DIAS L. C *et al.*, **DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS: UMA NOVA ERA DE DESAFIOS E OPORTUNIDADES**. *Quim. Nova*, Vol. 36, No. 10, 1552-1556, 2013.

DIAS, L. C. *et al.* **DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS: UMA NOVA ERA DE DESAFIOS E OPORTUNIDADES**. *Quim. Nova*, Vol. 36, No. 10, 1552-1556, 2013.

DOS SANTOS ALIANÇA, A. S.; OLIVEIRA, A. R.; FEITOSA, A. P. S.; RIBEIRO, K. R. C.; DE CASTRO, M. C. C. B.; LEITE, A. C. L.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A. **In vitro evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives**. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES*, v. 35, p. 01-15, 2017.

DRUGS FOR NEGLECTED DISEASES INITIATIVE (DNDi).
<http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases.html>. Acesso 19/11/2017.

DAWOOD, D.H.; BATRAN, R.Z.; FARGHALY, T.A.; KHEDR, M.A.; ABDULLA, M.M. **New Coumarin Derivatives as Potent Selective COX-2 Inhibitors: Synthesis, Anti-Inflammatory, QSAR, and Molecular Modeling Studies**. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, v. 348, p. 1–14, 2015.

DUFFY, B. C. *et al.* **Early phase drug discovery: cheminformatics and computational techniques in identifying lead series**. *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 20, n. 18, p. 5324–5342, 2012.

EISSAA, M. M.; MOSSALLAMA, S. F.; AMERA, E. I.; YOUNISB, L. K.; RASHEDA, H. A. **Repositioning of chlorambucil as a potential anti-schistosomal**. *Acta Tropica* 166, 58–66, 2017.

EL-BESHBISHIA, S. N.; EL BARDICYB, S.; TADROSB, M.; AYOUBB, M.; TAMANA, A. **Spotlight on the in vitro effect of artemisinin–naphthoquine phosphate on Schistosoma mansoni and its snail host Biomphalaria alexandrina**. *Acta Tropica*, 141, 37–45, 2015.

ELEBRING, T.; GILL, A.; PLOWRIGHT, A. T. **What is the most important approach in current drug discovery: doing the right things or doing things right?** *Drug discovery today*, v. 17, n. 21-22, p. 1166–1169, 2012

ENGEL, J. A *et al.* **Profiling the anti-protozoal activity of anti-cancer HDAC inhibitors against Plasmodium and Trypanosoma parasites**. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance* 5, 117-126, 2015.

ESPÍNDOLA, J. W. P. *et al.* **Synthesis and structure–activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting Trypanosoma cruzi cruzain**. *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 101, 28 August 2015.

EVAN SECOR, W. **Water-based interventions for schistosomiasis control**. *Pathogens and Global Health*, v. 108, n. 5, p. 246–254, 2014.

FERREIRA, L. G., OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. **Target-based molecular modeling strategies for schistosomiasis drug Discovery**. *Future Med. Chem.* 7(6), 753–764, (2015)

FERREIRA, L G.; ANDRICOPULO, A.D. **Drug repositioning approaches to parasitic diseases: a medicinal chemistry perspective**. *Drug Discovery Today*, Volume 21, Number 10, October 2016.

FIGUEIREDO, T. C. S., **Síntese, Elucidação estrutural e avaliação do potencial esquistossomicida de novas tiosemicarbazonas**. Mestrado em Ciências Farmacêuticas – UFPE. Pernambuco. 2017

FONSECA N.C., DA CRUZ L.F., DA SILVA VILLELA F., DO NASCIMENTO PEREIRA G.A., DE SIQUEIRA-NETO J.L., KELLAR D., SUZUKI B.M., RAY D., DE SOUZA T.B., ALVES R.J., SALES JÚNIOR P.A., ROMANHA A.J., MURTA S.M., MCKERROW J.H., CAFFREY C.R., DE OLIVEIRA R.B., FERREIRA R.S. **Synthesis of a sugar-based thiosemicarbazone series and structure-activity relationship versus the parasite cysteine proteases rhodesain, cruzain, and Schistosoma mansoni cathepsin B1**. *Antimicrob Agents Chemother* May;59(5):2666-77, 2015.

FREZZA, T.F.; MADI, R. R.; BANIN, T. M.; PINTO, M. C.; SOUZA, A. **Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de Schistosoma mansoni**. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* 28, 209–214, 2007.

- GREENBERG, R. M. **Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action?** International Journal for Parasitology. 35, 1–9 p. 2005.
- GUIDO, R. V. C. & OLIVA, G. **Structure-Based Drug Discovery for Tropical Diseases.** Current Topics in Medicinal Chemistry. 9, 824-843 p. 2009.
- GUPTA A.; ASTHANA S.; KONWAR R.; CHOURASIA M. K. **An insight into potential of nanoparticles-assisted chemotherapy of malária using gemcitabine and its fatty acid prodrug: a comparative study.** J. Biomed. Nanotechnol. 9(5), 915–925, 2013.
- HASSAN, M.F. AND RAUF, A. **Synthesis and multi-spectroscopic DNA binding study of 1,3,4-oxadiazole and 1,3,4-thiadiazol derivatives of fatty acid.** Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, v. 153, p. 510-516, 2016.
- 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 129 (1-2): 83- 87, 2005.
- ISMAIL, M. et al. **Characterization of isolates of S. mansoni from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel.** American Journal Tropical Medicine and Hygiene, v. 55, p. 214–218, 1996.
- JIANG S.; CROGAN-GRUNDY C.; DREWE J.; TSENG B.; CAI S. X.; **Discovery of (naphthalen-4-yl) (phenyl)methanones and N-methyl-N-phenylnaphthalen-1- amines as new apoptosis inducers using a cell- and caspase-based HTS assay.** Bioorg. Med. Chem. Lett. 18:5725–5728, 2008.
- KAMEL R.O.A. *et al.* **Ultrastructural alterations in Schistosoma mansoni juvenile and adult male worms after in vitro incubation with primaquine.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 112(4): 247-254, 2017
- KATZ, A. & ALMEIDA, K.; **Esquistossomose, xistosa, barriga d'água.** Cienc. Cult. [online] 55 (1), 38-43 p. 2003.
- KATZ, A. & COELHO, P. M. Z. **Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The Brazilian contribution.** Acta Tropica. 108, 72–78 p. 2008.
- KATZ, N. **Terapêutica clínica na esquistossomose mansoni.** Schistosoma mansoni e Esquistossomose, uma visão multidisciplinar. Cap. 29, p.849-871, 2008a.
- KEISER, J.; CHOLLET, S.H.; XIAO, J.Y.; MEI, P.Y.; JIAO, J.; UTZINGER, M. TANNER. **Mefloquine-an aminoalcohol with promising antischistosomal properties in mice.** PLoS Negl. Trop. Dis. 3, 350, (2009)
- KIER, L. B. & HALL, L. H. **Bioisosterism: Quantitation of Structure and Property Effects.** CHEMISTRY & BIODIVERSITY, Vol. 1, 138-151 p. 2004.

KUMAR, K. *et al.* **Highly potent anti-proliferative effects of a gallium(III) complex with 7-chloroquinoline thiosemicarbazone as a ligand: Synthesis, cytotoxic and antimalarial evaluation.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 86, 30 October 2014.

LAMBERTUCCI, J. R. *et al.* **Imaging techniques in the evaluation of morbidity in schistosomiasis mansoni.** *Acta Tropica* 108, 209–217 p. 2008.

LANGEDIJK, J.; MANTEL-TEEUWISSE, A. K.; SLIJKERMAN, D. S.; SCHUTJENS, M. D. B. **Drug repositioning and repurposing: terminology and definitions in literature.** *Drug Discovery Today* Volume 00, Number 00 May 2015

LEE, E. F.; FAIRLIE, W. D. **Repurposing apoptosis-inducing cancer drugs to treat schistosomiasis.** *Future Med. Chem.* 7(6), 707–711, 2015.

LOBANA, T.S. *et al.* **Bonding and structure trends of thiosemicarbazone derivatives of metals—An overview.** *Coordination Chemistry Reviews*, v. 253, p. 977–1055, 2009.

MAFUD, A. C.; FERREIRA, L.G.; MASCARENHAS, Y. P. ANDRICOPULO, A. D.; DE MORAES, J. **Discovery of Novel Antischistosomal Agents by Molecular Modeling Approaches.** *Trends in Parasitology*, November 2016, Vol. 32, No. 11

MAHRAN M.A., WILLIAM S., RAMZY F., SEMBEL A.M. **Synthesis and in vitro evaluation of new benzothiazole derivatives as schistosomicidal agents.** *Molecules*, Mar 26;12(3):622-33, 2007.

MANNECK T, HAGGENMULLER Y, KEISER J. **Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*.** *Parasitology* 137:85–98, 2010.

MANNHOLD, M.; KUBINYI, R.; FOLKERS, G. **Bioisosteres in Medicinal Chemistry.** First Edition, Wiley-VCH, 3-14 p. 2012.

MARELLA, A; SHAQUIQUZZAMAN, M; AKHTER, M; VERMA, G; ALAM, MM. **Novel pyrazole-pyrazoline hybrids endowed with thioamide as antimalarial agents: their synthesis and 3D-QSAR studies.** *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, v. 21, p. 1-10, 2014.

MASIMIREMBWA CM, BREDBERG U, ANDERSSON TB. **Metabolic stability for drug discovery and development.** *Clinical Pharmacokinetics*, 42(6):515-528. 2003

MELOS, J. L. R. *et al.* **Novel 3,4-methylenedioxyde-6-X-benzaldehyde-thiosemicarbazones: Synthesis and antileishmanial effects against *Leishmania amazonensis*.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 103, 20 October 2015.

MINUTOLO, F.; SALA, G.; BAGNACANI, A.; BERTINI, S.; CARBONI, I.; PLACANICA, G.; PROTA, G.; RAPPOSELLI, S.; SACCHI, N.; MACCHIA, M.; GHIDONI, R. **Synthesis of a resveratrol analogue with high ceramide-mediated**

proapoptotic activity on human breast cancer cells. J. Med. Chem. 48 (22), 6783–6786, 2005.

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Mortalidade – Brasil. Óbitos p/Residênc por Região/Unidade da Federação e Ano do Óbito. Causa - CID-BR-10: 028 Esquistossomose.** <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/julho/11/obitosesquistossomose.pdf> Acessado em 19/11/2017

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Morbidade Hospitalar do SUS - por local de residência – Brasil. Internações por Região/Unidade da Federação e Ano processamento. Lista Morb CID-10: Esquistossomose.** <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/Esquistossomose---N--mero-de-interna----es---Brasil--por-Regi--o-e-Unidade Federada.%201998%20a%202016..pdf> Acessado em 19/11/2017a

MS. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Mortalidade – Brasil. Óbitos p/Residênc por Região/Unidade da Federação e Ano do Óbito. Causa - CID-BR-10: 028 Esquistossomose.** <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/Esquistossomose---N--mero-de-casos-na---rea-end--mica---Brasil-2000-a-2016.pdf> Acessado em 19/11/2017b

MOREIRA, D. R. M.; SANTOS, D. S.; DO ESPÍRITO SANTO, R. F.; EVANGELISTA DOS SANTOS, F.; DE OLIVEIRA FILHO, G. B.; LEITE, A. C. L.; SOARES, M. B. P.; VILLARREAL, C. F. **Structural improvement of new thiazolidinones compounds with antinociceptive activity in experimental chemotherapy-induced painful neuropathy.** Chemical Biology & Drug Design (Print), v. 01, p. 01-010, 2017.

MOREIRA D.R.M. *et al.* **Conformational restriction of aryl thiosemicarbazones produces potent and selective anti-Trypanosoma cruzi compounds which induce apoptotic parasite death.** European Journal of Medicinal Chemistry 75, 467 e 478, 2014.

MORENO-RODRÍGUEZ, A. *et al.* **In vitro antiparasitic activity of new thiosemicarbazones in strains of Trypanosoma cruzi.** European Journal of Medicinal Chemistry, Volume 87, 24, Pages 23-29, November 2014.

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 visão interdisciplinar. Rio de Janeiro: Fiocruz 207-244, 2008.

NOGI, T.; ZHANG, D.; CHAN, J. D.; MARCHANT, J. S. **A Novel Biological Activity of Praziquantel Requiring Voltage-Operated Ca²⁺ Channel β Subunits: Subversion of Flatworm Regenerative Polarity.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 3, n. 6, p. e464, 2009.

Nwaka, S.; Hudson, A. **Innovative lead discovery strategies for tropical diseases.** Nat. Rev. Drug Discov. 5 941–955, 2006.

OLIVEIRA; J.F *et al.* **Thiosemicarbazones and 4-Thiazolidinones Indole-based derivatives: synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death**

mechanisms and topoisomerase inhibition assay. European Journal of Medicinal Chemistry, v. 136, p. 305-314, 2017.

OLIVEIRA, J. F. *et al.* **Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor.** European Journal of Medicinal Chemistry, Volume 104, 2, Pages 148-156, November 2015.

PACCA, C.C.; MARQUES, R. E.; ESPINDOLA, J. W. P.; FILHO, G. B.O. O.; Leite, A. C. L.; TEIXEIRA, M. M.; NOGUEIRA, M. L. **Thiosemicarbazones and Phthalyl-Thiazoles compounds exert antiviral activity against yellow fever virus and Saint Louis encephalitis virus.** Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 87, p. 381-387, 2017.

PAKRAVAN, P.; MASOUDIAN, S. Study on the Interaction between Isatin- β -Thiosemicarbazone and Calf Thymus DNA by Spectroscopic Techniques. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, v. 14, p. 111-123, 2015.

PAPE, V.F.S.; TOTH, S.; FÜREDI, A.; SZEBENYI, K.; LOVRICS, A.; SZABO, P.; WIESE, M.; SZAKACS, G. **Design, synthesis and biological evaluation of thiosemicarbazones, hydrazinobenzothiazoles and arylhydrazones as anticancer agents with a potential to overcome multidrug resistance.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 117, p. 335-354, 2016.

PEREIRA, A. C.; MÁRCIO L.A.; JULIA MEDEIROS SOUZA, J. M.; LAURENTIZ, R. S.; RODRIGUES, V.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M.; TAVARES, D. C.; DA SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W. R.; BASTOSE, J. K.; MAGALHÃES, L. G. **In vitro and in vivo anthelmintic activity of (-)-6,6-dinitrohinokinin against schistosomula and juvenile and adult worms of Schistosoma mansoni.** Acta Tropica 149 ,195–201, 2015.

PEREIRA HM, BERDINI V, FERRI MR, CLEASBY A, GARRATT RC. **Crystal structure of Schistosoma purine nucleoside phosphorylasecomplexed with a novel monocyclic inhibitor.** Acta Trop. 114:97–102, 2010.

PEREIRA, D. G. **Importância Do Metabolismo No Planejamento De Fármacos.** Quim. Nova, Vol., 30, No. 1, 171-177 p. 2007.

PICA-MATTOCCIA, L. & CIOLI, D. **Sex- and stage-related sensitivity of Schistosoma mansoni to in vivo and in vitro praziquantel treatment.** International Journal for Parasitology, 34, 527–533 p. 2004.

PICA-MATTOCCIA, L. *et al.* **Cytochalasin D abolishes the schistosomicidal activity of praziquantel.** Experimental Parasitology, 115, 344–351 p. 2007.

RAO, V.A. **Iron chelators with topoisomerase-inhibitory activity and their anticancer applications.** *Antioxid. Redox Signal.* 18, 930–955, 2013

RESCIFINA, A.; ZAGNI, C.; VARRICA, M.G.; PISTARÀ, V.; CORSARO, A. **Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: Synthesis, activity, and modeling.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 74, p. 95-115, 2014

SARKAR, S.; BHATTACHARJEE, P.; BHADRA, K. **DNA binding and apoptotic induction ability of harmalol in HepG2:Biophysical and biochemical approaches.** *Chemico-Biological Interactions* 258 (2016) 142e152

SAMALA, G.; DEVI, P.B.; NALLANGI, R.; SRIDEVI, P. J.; SAXENA, S.; YOGEE SWARI, P.; SRIRAM, D. Development of novel tetrahydrothieno[2,3-c]pyridine-3-carboxamide based Mycobacterium tuberculosis pantothenate synthetase inhibitors: Molecular hybridization from known antimycobacterial leads. ***Bioorganic and Medicinal Chemistry***, v. 22, p. 1938-1947, 2014

SANTIAGO, E. F. *et al.* **Evaluation of the Anti-Schistosoma mansoni Activity of Thiosemicarbazones and Thiazoles.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* p. 352–363 January 2014.

SAVIOLI L, ALBONICO M, ENGELS D, MONTRESOR A. **Progress in the prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis.** *Parasitol Int.*;53:103-13. 2004.

SHARMA, V.; KUMAR, P.; PATHAK, D. **Biological Importance of the Indole Nucleus in Recent Years: A Comprehensive Review.** *J. Heterocyclic Chem.*, 47, 491 (2010).

SINDERMANN, H. *et al.* **Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against leishmaniasis.** *Med. Microbiol. Immunol.* 193, 173–180, 2004.

SIRAJUDDIN, M.; ALI, S.; BADSHAH, A. **Drug-DNA interactions and their study by UV-Visible, fluorescence spectroscopies and cyclic voltametry.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 124, p. 1-19, 2013.

SRAVANTHI T. V.; MANJU, S. L. **Indoles— A promising scaffold for drug development.** *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Volume 91, Pages 1-10, August 2016.

SOUZA, F. P. C. *et al.* **Esquistossomose mansônica: aspectos gerais, imunologia, patogênese e história natural.** *Rev Bras Clin Med.* São Paulo, 9(4):300-7. jul-ago-2011.

STELMA, F.F.; TALLA, I.S.; Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.53, p.167-170, 1995.

SU, D.; NIANA, Y.; ZHANGA, F.; HUA, J.; CUIA, J.; ZHOUA, M.; YANGA, J.; WANG, S. **Thiazolidine reacts with thioreactive biomolecules.** *Free Radical Biology and Medicine* 104, 272–279, 2017.

TALLIMA, H. & RIDI, R. E. **Praziquantel binds *Schistosoma mansoni* adult worm actin.** *International Journal of Antimicrobial Agents*. 29, 570–575 p., 2007.

TENÓRIO, R. P. *et al.* **TIOSSEMICARBAZONAS: MÉTODOS DE OBTENÇÃO, APLICAÇÕES SINTÉTICAS E IMPORTÂNCIA BIOLÓGICA.** Quim. Nova, Vol. 28, No. 6, 1030-1037, 2005.

VERMA, A.; SARAF, S.K. **4-Thiazolidinone e A biologically active scaffold.** European Journal of Medicinal Chemistry, v. 43, p. 897-905, 2008.

WONG-BERINGER, A. *et al.* **Lipid formulations of amphotericin B: clinical efficacy and toxicities.** Clin. Infect. Dis. 27, 603–618, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). 2017.
<http://www.who.int/schistosomiasis/en/>. Acesso 19/11/2017

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Media centre – Schistosomiasis. Factsheet N°115 - Outubro 2017.**
www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html. Acessado no dia 19/11/2017a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Why are some tropical diseases called "neglected"?** Online Q&A January, 2012.

YEPES, E.; VARELA, R. E.; LOPEZ-ABAN, J.; DAKIR, E. L. H.; MOLLINEDO, F.; ANTONIO MURO, A. **In Vitro and In Vivo Anti-Schistosomal Activity of the Alkylphospholipid Analog Edelfosine.** Plos One. Volume 9, Issue 10. October 2014.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA- CEUA/FIOCRUZ


 Ministério da Saúde
 FIOCRUZ
 Fundação Oswaldo Cruz
 Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

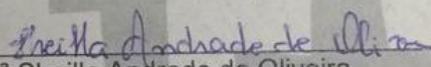
Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: **Avaliação da atividade biológica de compostos naturais e sintéticos sobre *Schistosoma mansoni***, protocolado sob nº 69/2014 pelo (a) pesquisador (a) Luiz Carlos Alves. Está 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 30/03/2015. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até fevereiro de 2018.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongos Mus músculos Swiss macho	364

We certify that project entitled **Avaliação da atividade biológica de compostos naturais e sintéticos sobre *Schistosoma mansoni***. Protocol nº 69/2014, 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 March, 30, 2015. In present version this project is licensed and valid until February, 2018.

Recife (PE, Brazil) April, 07, 2015.


 Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira
 Coordenadora CEUA/CPqAM

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE
 Recife - PE - CEP: 50.670-420
 Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
 www.cpqam.fiocruz.br