



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

MIRIA DE OLIVEIRA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*SCHISTOSOMA MANSONI* DE NOVOS
FTALIMIDO-TIAZÓIS**

Recife

2018

MIRIA DE OLIVEIRA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*SCHISTOSOMA MANSONI* DE NOVOS
FTALIMIDO-TIAZÓIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora.

Área de concentração: Inovação Terapêutica

Orientadora: Profa. Dr^a. Ana Cristina Lima Leite

Coorientadora: Profa. Dr^a. Sheilla Andrade Oliveira

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Barbosa, Miria de Oliveira
Avaliação da atividade anti-*Schistosoma mansoni* de novos
ftalimido-tiazóis / Miria de Oliveira Barbosa - 2018.
64 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Ana Cristina Lima Leite
Coorientadora: Sheilla Andrade Oliveira
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro
de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação
Terapêutica. Recife, 2018.

Inclui referências e anexo.

1. Esquistossomicida 2. Ftalimido-tiazóis 3. Profilática
I. Leite, Ana Cristina Lima (orient.) II. Oliveira, Sheilla Andrade
(coorient.) III. Título

615.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-168

MIRIA DE OLIVEIRA BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*SCHISTOSOMA MANSONI* DE NOVOS
FTALIMIDO-TIAZÓIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutora.

Aprovada em: 25 de Julho de 2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Ana Cristina Lima Leite
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Michelly Cristiny Pereira
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Danielle Maria Nascimento Morura
Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

Prof. Dr. Gevânio Bezerra de Oliveira Filho
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esse trabalho aos meus pais Osias e Glória.

AGRADECIMENTOS

À Deus dedico toda a minha vida como forma de gratidão pelo dom da vida e da salvação. Por Ele todas as coisas foram feitas e sem Ele nada do que foi feito, se fez.

Agradeço imensamente aos meus pais Osias e Glória por todo amor dispensado a mim e pelo apoio incondicional em toda a caminhada da vida. Minha carreira é fruto do esforço de vocês por mim. Agradeço a minha irmã pela sua presença na jornada.

Agradeço à minha orientadora Ana Cristina Lima Leite pela grande oportunidade a mim concedida durante toda a pós-graduação e pelos momentos de aprendizado intensos que vivemos.

Agradeço à minha orientadora Sheilla Andrade por tão valiosos momentos de aprendizagem e cuidado, aconselhamento e impulso direcionados a mim.

Estou grata aos amigos de laboratório e de vida que se formaram durante 6 anos da pós-graduação. Deus foi muito bom de colocar vocês em meu caminho. Aos amigos do LpQM minha gratidão, mas em especial a Arsênio, Daura, Dayane, Gevanio, Lucianna e Paulo André que sempre estiveram junto a mim. (Eu não sei onde encaixar Aurora nesse grupo) Aos amigos do LIBM (Alex, Camila, Fernanda, Jessica, Renata, Roni e Veruska) meu muito obrigado. Ao meu amigo de aventuras, Carlos Miranda, meu sentimento de gratidão profunda.

Aos meus amigos da igreja e pequenos grupos, eu agradeço demais. Vocês foram essenciais no meu sustento espiritual e físico. Deus usou poderosamente a vida de cada um para me ajudar na caminhada. Obrigado por todos os momentos de intercessão e ajuda dados a mim.

Aos meus amigos, meu agradecimento especial. Foram momentos de “de repente” que foram preciosos na minha vida. Eu agradeço demais aos meus venezianos e fulerinhos. Agradeço aos que conversam “about life” e à preciosa gangue que me diverte demais. Eu amo demais cada um de vocês.

Aos colaboradores que se juntaram à mim nesse processo tão sacrificial.

Aos órgãos que fomentaram toda a minha pesquisa e meus custos.

A todos aqueles que estiveram comigo em todos os momentos dessa caminhada: no laboratório, na sala de cultura, nos almoços, nas broncas.

RESUMO

A esquistossomose mansônica é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma doença negligenciada e afeta cerca de 240 milhões de pessoas em todo mundo. A quimioterapia para a enfermidade é composta por apenas dois fármacos, no entanto, apenas um é indicado para o tratamento em massa, o praziquantel. Além de possuir gosto amargo e uma série de efeitos colaterais, há relatos de possível resistência de algumas cepas ao princípio ativo e uma baixa adesão da população ao tratamento. Mediante os fatos acima, a busca por novos fármacos que atuem na forma adulta e forma larval do *Schistosoma mansoni* é necessária e urgente. Com o objetivo de identificar novos compostos protótipos que possuam atividade esquistossomicida, a atividade anti- *S. mansoni* de 9 compostos heterocíclicos classificados como ftalimido-tiazol foi testada e analisada. Almejando compreender a relação-estrutura atividade para essa classe de compostos, a atividade esquistossomicida foi determinada por ensaios de efetividade. Camundongos Swiss foram infectados com 120 cercárias e após cinquenta e cinco dias foram obtidos vermes adultos e incubados com as moléculas numa concentração que variou entre 5µg/mL até 100µg/mL durante um período de 144 horas. Os derivados com melhores resultados foram submetidos à análise ultraestrutural onde os parasitos foram incubados por até 48 horas. As moléculas clorossustituídas (As-06, As-12 e As-13) também foram testadas contra a forma larval do parasito e demonstraram-se ativo mesmo na concentração de 2,5µg/mL e tempo de 48 horas. O composto As-13 demonstrou melhor atividade esquistossomicida e por isso, foi encaminhado ao tratamento vira oral na fase aguda da esquistossomose. Nesse contexto, a análise da mortalidade dos vermes adultos, diminuição da oviposição e a atividade antifibrosante desses compostos indicaram uma tendência na diminuição de vermes adultos recuperados o que pode nos indicar a possibilidade de um novo hit na terapêutica da esquistossomose mansônica.

Palavras-chave: Esquistossomicida. Ftalimido-tiazóis. Profilática. *Schistosoma mansoni*.

ABSTRACT

Schistosomiasis mansoni is considered by the World Health Organization as a neglected disease and affects around 240 million people worldwide. The chemotherapy for disease is composed of only two drugs, however, only one is indicated for mass treatment, praziquantel. Besides having bitter taste and a number of side effects, there are reports of possible resistance to the active principle against some strains and a low adherence of population to treatment. Through the above facts, the search for new drugs that act on the adult form and larval form of *Schistosoma mansoni* is necessary and urgent. In order to identify new prototype compounds that have schistosomicidal activity, the anti-*S. mansoni* activity of 9 heterocyclic compounds classified was tested and analyzed. Desiring to understand the relation-structure activity for compounds phtalimido-thiazole, the schistosomicidal activity was determined by effectiveness tests. Swiss mice were infected with 120 cercariae and after fifty-five days adult worms were incubated with the molecules in a concentration ranging from 5µg/ml to 100µg/ml over a period of 144 hours. The best results were submitted to ultrastructural analysis where the parasites were incubated for up to 48 hours. Chlorosubstituted molecules (As-06, As-12 and As-13) were also tested against the larval form of the parasite and were shown to be active even at a concentration of 2.5 µg/ml of 48 hours. Compound As-13 demonstrated better schistosomicidal activity and was therefore referred to oral treatment in the acute phase of schistosomiasis. In this context, the analysis of adult worms mortality, decreased oviposition and antifibrous activity of these compounds indicated a tendency to decrease recovered adult worms which may indicate the possibility of a new hit in the treatment of *schistosomiasis mansoni*.

Keywords: Phtalimido-thiazole. Prophylactic. Schistosomiasis. *Schistosoma mansoni*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ciclo da esquistossomose.....	19
Figura 2 – Microscopia Eletrônica de Varredura do Esquistossômulo.....	20
Figura 3 – Estrutura química da Oxamniquine e Praziquantel, respectivamente.....	22
Figura 4 – Estrutura Química do Tiazol.....	27
Figura 5 – Estrutura química do LpQM-45.....	27
Figura 6 – Compostos ftalimido-tiazóis em estudo.....	34
Figura 7 – Microscopia Eletrônica de Varredura dos vermes adultos submetido a 1xEC50 do As-13.....	43
Figura 8 – Microscopia Eletrônica de Varredura dos vermes adultos submetido a 2xEC50 do As-13.....	44
Figura 9 – Microscopia óptica dos esquistossômulos incubados com As-06.....	45
Figura 10 – Imagem de Microscopia Eletrônica de varredura dos vermes recuperados após o tratamento de 5 dias com As-13.....	48

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Gráfico de mortalidade de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> em porcentagem na dose de 100µg/mL.....	38
Gráfico 2 – Gráfico de mortalidade dos vermes machos e fêmeas na presença dos compostos As-06, As-12 e As13 em porcentagem na dose de 100µg/mL.....	39
Gráfico 3 – Relação entre o número de vermes adultos recuperados e a média do grupo.....	47
Gráfico 4 – Gráfico representando número de ovos no fígado e intestino.....	49
Gráfico 5 – Número de ovos divididos por estágios morfológicos e terapia utilizada.....	50
Gráfico 6 – Percentual de tecido fibroso por grupo e terapia utilizada.....	51
Gráfico 7 – Quantificação de hidroxiprolina no tecido hepático.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultado dos cálculos realizados no chemicalize.....	36
Tabela 2 – Efeito in vitro dos derivados ftalimido-tiazóis contra os vermes adultos de <i>S.</i> <i>mansoni</i>	40
Tabela 3 – Atividade esquistossomocida in vitro, citotoxicidade e índice de seletividade.....	42
Tabela 4 – Mortalidade de esquistossômulos em porcentagem (%)	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PZQ	Praziquantel
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
OXA	Oxamniquine
WHO	World Health Organization
OMS	Organização Mundial da Saúde
MAO	Monoamino Oxidase
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
LpQM	Laboratório de Planejamento em Química Medicinal
LIBM	Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular
PPGIT	Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS GERAIS	16
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	HISTÓRICO E CARACTERÍSTICAS	17
2.2	CICLO DO <i>S. MANSONI</i>	18
2.3	ESQUISTOSSÔMULOS	19
2.4	PATOGENIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA	21
2.5	TRATAMENTO	21
2.5.1	Oxamniquine	23
2.5.2	Praziquantel	24
2.6	PERSPECTIVAS DE NOVOS FÁRMACOS	24
2.7	FTALIMIDA	26
2.8	THIAZÓIS	26
3	METODOLOGIA	28
3.1	MOLÉCULAS	27
3.2	INFECÇÃO PELO <i>S. MANSONI</i>	28
3.3	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE VERMES ADULTOS E IMATUROS DE <i>S. MANSONI</i> FRENTE AOS COMPOSTOS	29
3.4	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE VERMES ADULTOS DO <i>S. MANSONI</i> TRATADOS COM OS COMPOSTOS	29
3.5	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE <i>IN VITRO</i> DE VERMES DE <i>S. MANSONI</i> NA FORMA LARVAL FRENTE AOS COMPOSTOS	30
3.6	PREPARAÇÃO DE SUSPENSÃO PARA O ENSAIO <i>IN VIVO</i>	30
3.7	AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE <i>IN VIVO</i> DE VERMES ADULTOS DE <i>S. MANSONI</i> FRENTE AOS COMPOSTOS MAIS PROMISSORES	31
3.8	AVALIAÇÃO PARASITOLÓGICA DO AS-13	31
3.8.1	Obtenção e contagem dos vermes adultos	32
3.8.2	Contagem dos ovos do Fígado e no intestino	32
3.8.3	Oograma	32
3.8.4	Avaliação morfométrica	32
3.8.5	Ensaio de Hidroxiprolina	33
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
3.10	ASPECTOS ÉTICOS	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1	SELEÇÃO DE NOVOS FTALIMIDO-THIAZÓIS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI- <i>S. MANSONI</i>	34
4.2	DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DAS MOLÉCULAS	35
4.3	EFEITO ESQUISTOSSOMICIDA DOS DERIVADOS FTALIMIDO-THIAZÓIS NA CONCENTRAÇÃO DE 100 µG/ML SOBRE VERME ADULTO DE <i>S. MANSONI</i>	36

4.4	EFEITO DOS CANDIDATOS FTALIMIDO-TIAZÓIS NAS CONCENTRAÇÕES DE 5 µg/mL A 100 µg/mL	40
4.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	42
4.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FTALIMIDO-TIAZÓIS EM FORMAS LARVAIS DO <i>S. MANSONI</i>	45
4.7	PREPARAÇÃO DE SUSPENSÃO PARA O ENSAIO <i>IN VIVO</i>	46
4.8	EFEITO DE AS-13 SOBRE A CARGA PARASITÁRIA DOS ANIMAIS TRATADOS APÓS 45 DIAS DE INFECÇÃO POR <i>S. MANSONI</i>	46
4.9	EFEITO DO AS-13 SOBRE A QUANTIDADE DE OVOS NOS ÓRGÃOS	48
4.10	EFEITO DO AS-13 SOBRE O ESTADIAMENTO DE OVOS DE <i>S. MANSONI</i> NO INTESTINO	49
4.11	MORFOMETRIA	51
4.12	HIDROXIPROLINA	52
5	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA	64

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária, causada por vermes trematódeos, do gênero *Schistosoma*. No Brasil, estima-se que cerca de 1,5 milhões de pessoas vivem em áreas sob o risco de contrair a doença causada pelo *Schistosoma mansoni*. Os estados das regiões Nordeste e Sudeste são os mais afetados sendo que a ocorrência está diretamente ligada à presença dos moluscos transmissores. Sendo assim, devido aos elevados índices de prevalência e ao alto grau de comorbidades decorrentes dessa parasitose, a infecção é descrita como problema de saúde pública no país (BRASIL, 2018).

O *S. mansoni* tem um ciclo de vida complexo que requer um caramujo como hospedeiro intermediário. O estágio infeccioso do parasito é uma pequena larva de vida curta (cercária), que é liberada por caramujos infectados em água doce e invade ativamente a pele do hospedeiro vertebrado. Logo após a penetração, a cercária se transforma em uma larva parasitária imatura (esquistossômulo), que entra na circulação e migra em direção ao sistema porta-hepático e mesentérico. As larvas modificam seu tegumento com a finalidade de escapar do sistema imune enquanto ocorre a migração. Após o amadurecimento em vermes machos e fêmeas adultos, ocorre acasalamento e produzem um grande número de ovos. Muitos destes ovos deixam o corpo através das fezes, mas parte fica retido nos tecidos e induzem uma resposta imunológica granulomatosa, levando à fibrose tecidual progressiva e a danos aos órgãos. Sendo assim, a patologia está diretamente associada à presença de ovos (SAMOIL, 2018)

Atualmente existem dois fármacos na terapêutica contra a esquistossomose mansônica, o praziquantel (PZQ) e a oxaminiquine (OXA). O PZQ é um derivado pirazinoisoquinolina, que é utilizado como fármaco de escolha no tratamento da esquistossomose devido: a sua eficácia contra todas as espécies do *Schistosoma* que infectam os seres humanos, aos menores efeitos colaterais apresentados pelos indivíduos em relação aos fármacos esquistossomicidas anteriores, e ao seu baixo custo de produção (FENWICK et al., 2006; JEZIORSK et al., 2006; UTZINGER et al., 2001; TALLIMA et al., 2007). O mecanismo de ação para esse fármaco ainda é incerto, mas há fortes indícios de que o composto age nos canais de cálcio do parasito promovendo uma paralisia muscular e espasmos. (CIOLI et al., 1998; GREENBERG et al., 2005; ISMAIL et al.1996; JIRAUNGKOORSKUL et al. 2005; TALLIMA et al., 2007).

O praziquantel vem sendo utilizado por mais de 45 anos no combate à infecção da esquistossomose pela Organização Mundial da Saúde (OMS). O esquema terapêutico funciona da seguinte maneira: comunidades de alto risco devem ser tratadas a cada um ano, áreas de

risco moderado devem ser tratados a cada dois anos e comunidades de baixo risco devem ser tratadas duas vezes na sua idade escolar. (WHO, 2018)

O fato de ser altamente efetivo contra todas as formas de *Schistosoma* na fase adulta que infectam o homem e ter baixo custo de produção sustentam o praziquantel nesse esquema terapêutico, no entanto o medicamento possui muitos efeitos colaterais, sendo os principais: dor de barriga, enjôos, diarreia, vômitos, tonteira, sonolência e dor de cabeça e outros. (FIOCRUZ, 2016). Com isso, o número de indivíduos que participam do esquema terapêutico é cada vez menor. Além disso o PZQ não apresenta formulação pediátrica, o que torna inviável o tratamento de criança abaixo de quatro anos de idade.

Algumas áreas de possíveis resistências também são citadas na literatura após verificar-se uma diminuição da eficácia do PZQ em estudos experimentais com cepas da África. Essas cepas teriam sido resistentes ao tratamento após o contato com sucessivas infecções. (FALLON et al., 1995; GUISSÉ et al, 1997; ISMAIL et al, 1996; STELMA et al., 1995). Diante dessa falha quimioterápica, torna-se necessária e urgente a busca por novos fármacos que possam contribuir com o presente tratamento, na forma adulta do verme, e que atuem de forma profilática, antes do estabelecimento da doença.

A química medicinal vem crescendo e dando suporte à pesquisa de novos candidatos a fármacos para as mais diversas áreas da medicina. Sua multidisciplinaridade possibilita a inovação na busca por uma melhor especificidade e seletividade da molécula ao seu alvo. Nesses aspectos, os derivados heterocíclicos tomaram-se compostos líderes para a indústria farmacêutica por possuírem estruturas promissoras para novos fármacos.

Em um *screening* inicial promovido por nosso grupo de pesquisa (SANTIAGO, 2014), encontrou-se uma atividade favorável contra *S. mansoni*. O grupo farmacofórico ftalimido-tiazol se destacou e após algumas modificações estruturais se tornaram instrumento dessa pesquisa. Os tiazóis já são bastante conhecidos e utilizados na terapêutica por sua atividade antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória e inibidores da MAO. (BONDOCK et al, 2007; CHIMENTI et al, 2011; HOLLA et al, 2003; TURAN-ZITOUNI et al, 2008;). A ftalimida é um importante grupo farmacofórico em destaque na literatura por sua diversidade terapêutica.

Diante das informações supracitadas, novas moléculas portadoras do grupo farmacofórico ftalimido-tiazol, foram escolhidas para o estudo do potencial terapêutico de novas moléculas com atividade anti-*S. mansoni*. Dessa forma, espera-se contribuir com a descoberta de compostos protótipos ativos contra a esquistossomose mansônica.

A fim de efetuar uma varredura mais completa sobre a atividade esquistossomicida de nossos compostos, utilizou-se técnicas de análise ultraestrutural para avaliar os dados no

tegumento do parasito. Também buscou-se uma possibilidade de tratamento profilático para a esquistossomose mansônica (EM) onde foram realizados testes com esquistossômulos, forma larval do *S. mansoni*. O estágio larval do *S. mansoni* ocorre desde o momento de entrada do parasito até completar 21 dias em hospedeiro vertebrado. O intervalo entre a penetração da cercaria até a transformação em verme adulto, o parasito não produzirá ovos e, conseqüentemente não desencadeará a formação de granulomas nos tecidos do hospedeiro. Sendo assim, quando o ciclo é interrompido nessa fase não há o desenvolvimento da esquistossomose, e por isso a denominação de profilática para um possível tratamento.

Para a molécula As-13, melhor resultado encontrado dentre os 9 compostos testado, foi realizado um estudo *in vivo* a fim de verificar o potencial esquistossomicida do composto no modelo murino. Aspectos como diminuição da carga parasitária, quantificação de tecido fibroso no fígado e estradiamento dos ovos no intestido, foram avaliados.

Os compostos obtidos pelo Laboratório de Planejamento em Química Medicinal (LpQM) foram avaliados com relação ao seu potencial terapêutico através da realização de um “*screening*” *in vitro* onde foram testados nove compostos, sendo este grupo composto por moléculas possuidoras de diferentes grupos de substituintes a fim de avaliar a relação estrutural-atividade. Entre os compostos testados, os ftalimido-tiazóis substituídos com grupos halogenados demonstraram uma melhor atividade, sendo estes avaliados com relação à atividade na forma adulta e larval do verme.

1.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial terapêutico e profilático de novos ftalimido-tiazóis como candidatos a fármacos anti-*S.mansoni* frente às formas larval e adulta.

1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- *Avaliar *in vitro* a atividade esquistossomicida na forma adulta de novos ftalimido-tiazóis;
- *Avaliar *in vitro* a atividade esquistossomicida na forma larval de novos ftalimido-tiazóis;
- *Analisar as alterações morfológicas dos parasitos após tratamento com os derivados ftalimido-tiazóis;
- * Verificar *in vivo* a atividade antiparasitária no verme adulto e antifibrosante dos ftalimido-tiazóis em infecção de *S. mansoni* em modelo murino;

2 REVISÃO DA LITERATURA

A esquistossomose é uma doença crônica e debilitante. As estimativas da OMS mostraram que a doença afeta mais de 240 milhões de pessoas ao redor do mundo e mais de 700 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas. A parasitose é prevalente em áreas tropicais e sub-tropicais e especialmente em comunidades pobres sem acesso a água potável e saneamento básico. (WHO, 2018) A bilharziose ou barriga d'água, como também é conhecida a esquistossomose, é um grave problema de saúde pública no mundo, mas tem caráter endêmico na África, América do Sul, China e Sudeste Asiático. (ABDULLA *et al*, 2007)

Seis espécies de *Schistosoma* podem parasitar o homem, são elas: *S. haematobium*, *S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e *S. mansoni*. As morbidades mais severas desencadeadas pelos parasitos são fibrose hepática e intestinal causada pelo *S. mansoni* e *S. japonicum* e a fibrose da bexiga e ureter causado pelo *S. haematobium*. (ABDULLA *et al*, 2007).

O Brasil é o país com maior número de casos de esquistossomose mansônica na América e em Pernambuco o literal urbano está acometido em 80% (LEITE,2017). No ano de 2016, o número de casos positivos foram de mais de 3.700 casos. (DATASUS, 2018)

2.1 HISTÓRICO E CARACTERÍSTICAS

O *S. mansoni* é um dos agentes infecciosos mais abundantes da humanidade. Sua distribuição é permitida pela ampla distribuição geográfica de espécies sensíveis do gênero *Biomphalaria*, que servem como hospedeiros obrigatórios para seus estágios larvais. (MORGAN *et al*, 2003)

O gênero *Biomphalaria*, hospedeiro intermediário do *S. mansoni*, é amplamente distribuída em toda África, no vale e delta do Nilo, em partes do sudoeste Ásia, na América do Sul e em alguns focos nas ilhas do Caribe. (BROWN, 1994) (DE SOUZA e LIMA, 1997).

Não há nenhum registro fóssil que comprove o surgimento do gênero *Schistosoma*, mas possivelmente surgiu na África (DAVIS, 1981). A ligação histórica do parasito se retrata ao Egito, onde foi encontrado relatos na literatura de Homero, Hipócrates e Heródoto. O caso mais antigo de esquistossomose humana foi descoberto na múmia de um adolescente egípcio infectado pelo *S. haematobium* (DEELDER *et al.*, 1990). Existem dois tipos de parasitos com ovos de características diferentes, um tipo de ovo com espinho lateral e outros ovos com espinho terminal. Por causa das colonizações e tráfico negreiro, a esquistossomose e o

hospedeiro intermediário obrigatório se distribuíram amplamente pelo globo terrestre e continuam em expansão. (MORGAN, 2003)

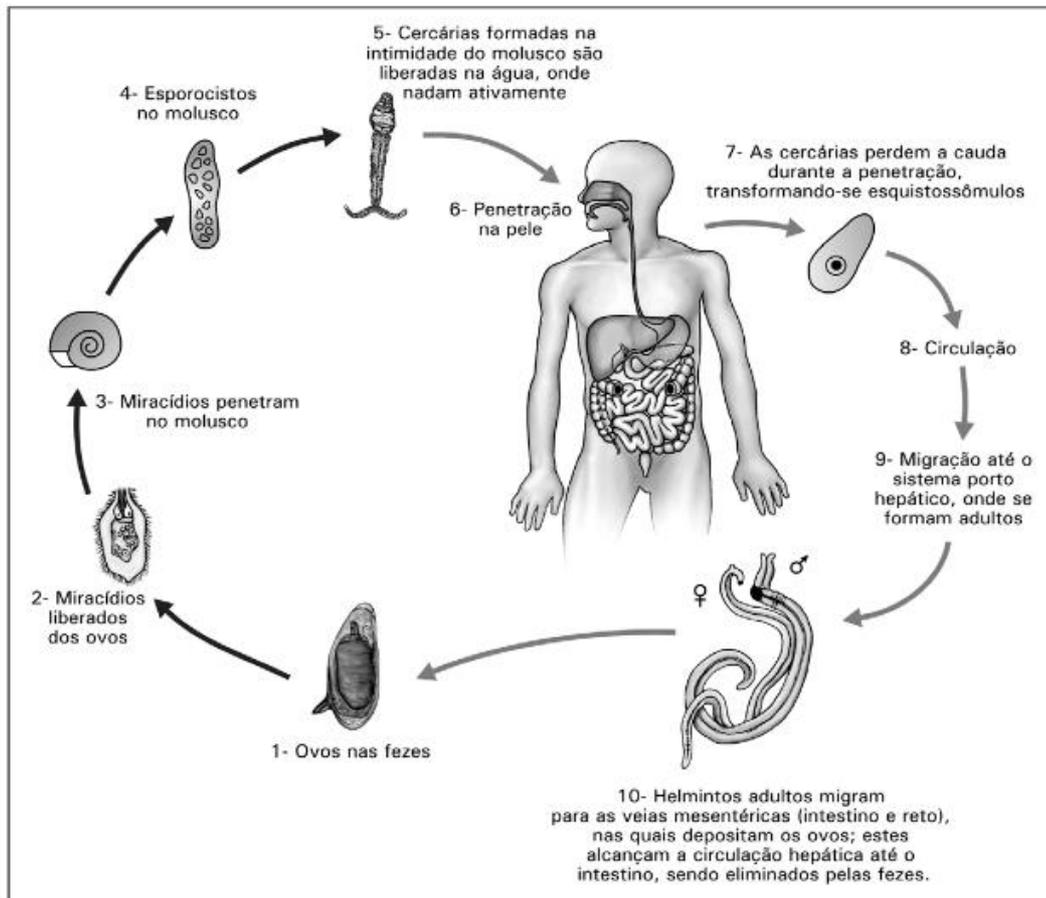
2.2 CICLO DO *S. MANSONI*

Para o desenvolvimento do *S. mansoni*, agente etiológico da doença esquistossomose mansônica, o ciclo do parasito descrito na figura 1, necessita correr duas fases, uma assexuada e dependente do hospedeiro intermediário (*Biomphalaria glabrata*) e outra sexuada dependente do hospedeiro vertebrado, homem ou qualquer outro mamífero suscetível. A transmissão da doença está relacionada ao contato com coleções hídricas contaminadas com fezes do hospedeiro vertebrado. A partir do contato com das fezes com a água e em condições de luz, turbidez, temperatura, pH e luminosidade adequada os ovos do *S. mansoni* eclodem e liberam uma larva ciliada denominada miracídio. (BRASIL, 2018) O miracídio penetra no hospedeiro intermediário e sofre modificação celular para esporocisto, forma de reprodução assexuada do parasito. Após um período de multiplicação da forma esporocística, o caramujo passa a liberar cercárias, forma infectante do hospedeiro definitivo. As cercárias na presença de adequadas condições de luminosidade, pH e temperatura nadam livremente pelas águas contaminadas e penetram ativamente na pele do hospedeiro definitivo (CARVALHO, 2008)

Após a penetração na pele humana a cercária sofre modificações bioquímicas e morfológicas e passam a se chamar de esquistossômulo. Estes penetram nos vasos sanguíneos e linfáticos e são conduzidos para pulmão e fígado, onde neste se transformam em vermes adultos. Após a migração do parasito para as veias mesentéricas, ocorre o acasalamento e iniciam a oviposição no lúmen intestinal. O ciclo sexuado dura cerca de 45 dias, e vai desde a penetração da pele até a oviposição (ABDULLA *et al*, 2007; SAYED *et al*, 2008).

Após a postura dos ovos, estes chegam à luz intestinal e são eliminados para o meio pelas fezes. Os ovos que não alcançam o lúmen intestinal são levados pela circulação e ficam retidos na parede intestinal e no fígado, e são circundados por uma resposta inflamatória granulomatosa (ALMEIDA, 2009).

Figura 1 - Ciclo da esquistossomose



Fonte : Souza (2011)

O ciclo da esquistossomose começa com a presença de ovos viáveis que em contato com água eclodem e liberam miracídeos, que é a forma infectante do hospedeiro intermediário. Os caramujos contaminados transformam os miracídeos em esporocistos que se dividem assexuadamente. As cercárias são liberadas sob temperatura e luminosidade ideal e nadam ativamente até encontrar o hospedeiro definitivo. No mamífero infectado o parasito passa por fases como esquistossômulos e migra até o fígado onde se transformam em vermes adultos.

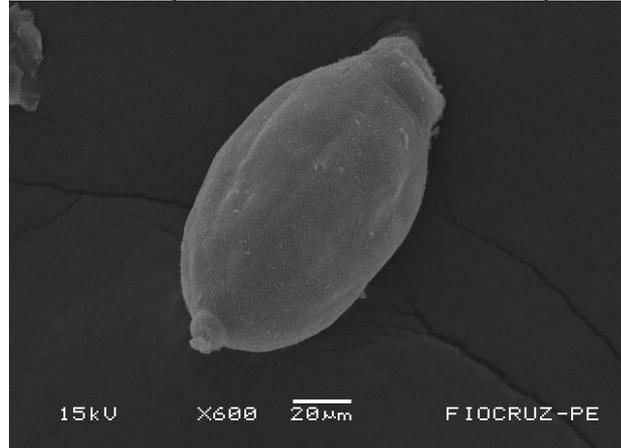
1-Ovos de *S. mansoni* presente nas fezes do hospedeiro vertebrado. 2-Miracídeos são formas ciliadas livre que nadam ativamente nas coleções hídricas até encontrar com o caramujo. 3-Caramujos do gênero *Biomphalaria* que são hospedeiros intermediários. 4-Esporocisto, forma de reprodução assexuada do parasito no caramujo. 5-Cercárias liberadas do caramujo sob osmolaridade, temperatura e pressão. 6-Penetração ativa das cercárias na pele do mamífero. 7-Os esquistossômulos são as cercárias que perderam sua cauda após a penetração da pele. 8-Os esquistossômulos ganham a circulação sanguínea após as primeiras 48 horas após a transformação. 9- Os esquistossômulos chegam até o fígado para sofrerem modificação morfológica. 10-Parasitas adultos se diferenciam em machos e fêmeas que são fecundadas e liberam ovos.

2.3 ESQUISTOSSÔMULOS

A transformação do *S. mansoni* do estágio cercariano para o esquistossomular é um evento no qual ocorrem inúmeras alterações bioquímicas, fisiológicas e morfológicas. (SALAFSKY *et al*, 1988). Durante a infecção parasitária por *S. mansoni*, diversos eventos são decisivos para o sucesso da infecção e evolução do parasito no hospedeiro definitivo. Após a liberação para meio aquoso das cercárias do *S. mansoni*, forma infectante da mucosa ou pele de

mamíferos, o agente penetrante inicia uma longa jornada da epiderme até atingir a circulação venosa. O esquistossômulo (Figura 2), após a penetração da pele do hospedeiro vertebrado, atravessa vários estágios extravasculares até chegar aos caminhos intravasculares passando por modificações físicas e bioquímicas, apresentando, portanto, duas fases bem distintas: pré-hepática e hepática.

Figura 2 - Microscopia Eletrônica de Varredura do Esquistossômulo



Fonte: A autora (2018)

Imagem de esquistossômulos com morfologia bem preservada obtida pela técnica de microscopia eletrônica de varredura.

Entre uma e três horas após a penetração das cercárias na pele do hospedeiro mamífero, um aumento na temperatura e osmolaridade iniciam modificações específicas necessárias para adaptação do parasito ao novo ambiente (COUSIN *et al*, 1986; STIREWALT, 1974). A transformação da cercária em esquistossômulo envolve: perda da cauda, eliminação da secreção proteolítica, eliminação do glicocálice que reveste a membrana da cercária, transformação da membrana do parasito de trilaminada para pentalamina, alteração do metabolismo de aeróbico para anaeróbico.

A alteração de metabolismo aeróbico para metabolismo anaeróbico também pode ser efetuada com o processo de transformação mecânica de esquistossômulos e incubando o resultante desse procedimento em meio *in vitro* adequado (GAZZINELLI *et al*, 1983; MACHADO *et al*, 1975). Com diversas alterações acontecendo ao mesmo tempo, o esquistossômulo se torna mais vulnerável nessa etapa, o que torna mais fácil a eliminação do parasito do mamífero infectado. Algumas etapas do metabolismo do parasito são prejudicadas com a transformação da cercaria em esquistossômulos

2.4 PATOGENIA DA ESQUISTOSSOMOSE MANSÔNICA

A patogênese da esquistossomose mansônica é dependente da interação humano/helminto. Durante as etapas do ciclo evolutivo do *S. mansoni* nos diferentes tecidos, o helminto passa por significantes alterações morfológicas e bioquímicas que servem para driblar o sistema imunológico do hospedeiro. Cada etapa desse processo suscita a ativação de complexos mecanismos imunológicos. A partir das primeiras 12 horas após a penetração das cercárias, observa-se importante reação inflamatória dérmica e subdérmica, originando a dermatite cercariana, a qual é capaz de destruir importante quantitativo de cercárias e esquistossômulos ainda na pele, esta é a primeira “linha de defesa” contra a infecção (DOENHOFF, 1987)

Os esquistossômulos, na passagem pelos pulmões, podem causar focos de arteriolite, arterite e necrose, além de infiltração de neutrófilos, linfócitos e eosinófilos. A transformação dos esquistossômulos em vermes adultos ocorre entre 30 e 60 dias após a infecção, coincidindo com o início das manifestações clínicas da esquistossomose aguda (FENWICK, 2006).

O evento patogênico mais importante na esquistossomose é a formação do granuloma hepático e a fibrose hepática periportal. Esta é mediada por várias subpopulações linfocitárias, induzindo resposta inflamatória e fibrótica em torno dos ovos alojados nos diferentes tecidos. Por ocasião da oviposição, cerca de 60% dos ovos alcançam a luz intestinal e o restante fica retido nos capilares da mucosa do intestino, ocasionando a morte do miracídio. Alguns ovos permanecem nesse local, ao passo que outros vão sendo carreados pela circulação mesentérica até o fígado, onde esbarram nos sinusóides hepáticos (SOUZA, 2011).

Entre as dificuldades supracitadas causadas pela esquistossomose, ainda pode existir lesões cardiopulmonares, glomerulonefrite, neurológicas e lesões no aparelho reprodutor masculino e feminino, podendo causar infertilidade (LAMBERTUCCI et al., 2010).

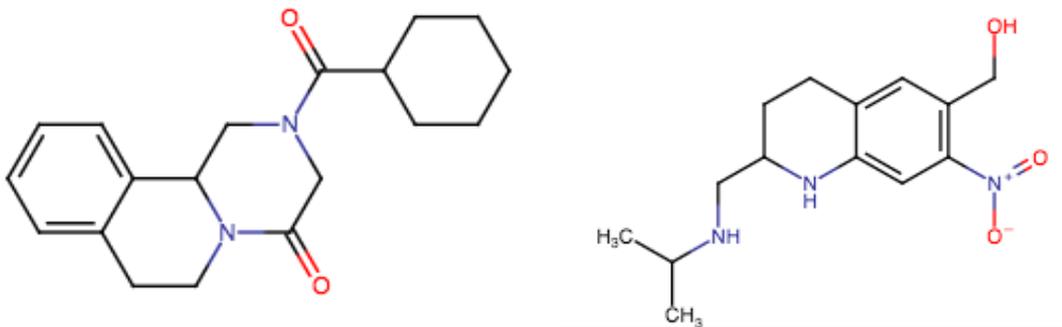
2.5 TRATAMENTO

O tratamento para esquistossomose tem como finalidade sua cura, redução da carga parasitária do hospedeiro, impedimento da evolução para as manifestações graves da doença, minimização de produção e eliminação dos ovos do helminto como uma forma de prevenção primária da transmissão. O tratamento pode ser direcionado individualmente ou em nível populacional, conhecido como tratamento coletivo. (VITORINO, 2012)

A estratégia de tratamento em massa envolve tratamento em larga escala de populações

inteiras e tipicamente focaliza grupos supostamente com a maior morbidade da doença, tais como crianças em idade escolar (5-15 anos) para esquistossomose. Na atualidade o tratamento da doença dispõe de dois fármacos : o praziquantel (PZQ) e a oxamniquine (OXA) (Figura 3). Ambos os fármacos são administráveis em dose única. A dosagem do praziquantel é 50 mg/kg e 60 mg/kg em crianças até 15 anos, enquanto para OXA a dose utilizada é de 15 mg/kg para adultos e 20 mg/kg em crianças. Essa última já possui formas farmacêuticas em cápsulas ou suspensões. No entanto, não é utilizado como fármacos de referência para o tratamento. (BRASIL, 2007)

Figura 3 - Estrutura química da Oxamniquine e Praziquantel, respectivamente



Fonte: A autora (2018)

Neste contexto, programas de controle da esquistossomose mansônica devem ser desenvolvidos considerando-se: quimioterapia efetiva, em massa ou individual, controle do hospedeiro intermediário, redução da contaminação da água ou do contato com esta, modificação das condições de vida das populações expostas e educação para a saúde.

A despeito desses bem sucedidos resultados, os medicamentos utilizados para eliminar os helmintos não impedem a reinfecção, daí a necessidade de se desenvolver um fármaco eficaz na forma larval do parasito. Deve-se considerar que o *S. mansoni* é um organismo multicelular que não se multiplica nem se divide no organismo humano e, portanto o número de parasito permanece estável pelo tempo de vida em organismo humano, caso não haja reinfecção. (VITORINO, 2012)

Como quimioterapia preventiva é considerada uma estratégia de controle e a possível erradicação da doença, a pesquisa e busca de novos fármacos que atuem nas fases iniciais do parasito dentro do hospedeiro definitivo deve ser considerada e apoiada (LO *et al*, 2017). Nesse intuito o teste de drogas desenvolvido nesse trabalho, visa a descoberta de um novo hit de um possível fármaco que atue na forma larval e adulta do parasito. Dessa forma, a interrupção do ciclo biológico em duas etapas visa impedir o desenvolvimento do parasito dentro do

hospedeiro vertebrado.

2.5.1 Oxamniquine

O fármaco denominado oxamniquine é um derivado quinolínico e foi desenvolvido em trabalhos de RICHARDS; FOSTER, 1969 e BAXTER; RICHARDS, 1971, quando trabalhavam na Pfizer localizada em Sandwich na Inglaterra. A nova série de 2-aminometil-tetra-hidroquinolínicos que apresentou marcante ação esquistossomicida foi derivada de uma série de 50 compostos. Essa molécula também denominada de UK4271 apresentou ação profilática por atuar em todos os estágios dos vermes quando avaliados em modelo murino animal. (KAYE; WOOLHOUSE, 1972; FOSTER, 1973; FOSTER *et al* 1973.)

A oxamniquine em dose única oral é suficiente para demonstrar atividade curativa. Em estudos pré-clínicos a curetagem da mucosa retal antes e após o tratamento evidenciaram o desaparecimento progressivo dos ovos imaturos e maduros e mesmo após a perfusão do sistema porta e do fígado vermes não foram coletados (PELLEGRINO *et al*, 1973). Em todos os hospedeiros expostos à infecção e tratamento, os vermes machos foram mais suscetíveis ao tratamento do que as fêmeas. Fato esse que não foi observado *in vitro* (FOSTER, 1973).

Apesar da eficácia contra vermes do *S.mansoni* a atividade eficaz não se repetiu em vermes de *S.haematobium* e *S.japonicum*. O mecanismo de ação da OXA parece estar relacionado com a capacidade de inibição irreversível da síntese de ácidos nucleicos nos vermes (CIOLI *et al*, 1995).

Os efeitos colaterais observados de forma mais comum em pacientes administrados com oxamniquine foram reações transitórias de tontura e sonolência, delírio e alucinações foram relatadas. Essas adversidades surgem em até 2 horas após a administração do fármaco e pode persistir por até 24 horas. Em uma pequena quantidade de pacientes, observou-se algumas alterações do sistema nervoso central, como irritabilidade, excitabilidade, alucinação e convulsão. Em outros exames também destaca-se a proteinúria, leucopenia e elevação dos níveis de transaminases plasmáticas. (BINA; SPINOLA, 1976; COUTINHO, 1975; DOMINGUES; KATZ *et al*, 1976; KATZ *et al*, 1977; KATZ, 1980; SILVA *et al*, 1974;)

2.5.2 Praziquantel

Os estudos do laboratório Bayer e Merk culminaram na descoberta de derivados pirazinoisoquinolínicos como um importante núcleo antiparasitário. O Embay 8440, também denominado de praziquantel, revelou-se o mais promissor da série de 400 compostos sintetizados pelas empresas na década de 1970 (WEBBE; JAMES, 1977).

O primeiro fármaco que demonstrou acentuada atividade por via oral contra as cinco principais espécies de *Schistosoma*. São elas: *S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum*, *S. mattheei* e *S. haematobium*.

Em estudos realizados com diferentes cepas de *S. mansoni* e tempos de infecção, ficou evidenciado que o efeito do PZQ no paciente é dependente de alguns tópicos como: carga parasitária, fatores genético, estado de acasalamento ou não dos vermes e entre outros. O estado imunitário do hospedeiro também pode ser relevante na quimioterapia, pois a resposta do hospedeiro à infecção definirá a continuidade da infecção. (PICA-MATTOCCIA ; CIOLI,2004; SABAH et al, 1985; DOENHOFF et al 1987; BRINDLEY; SHER,1987).

As principais alterações dos vermes adultos sensíveis ao praziquantel ocorrem horas após a ingestão do fármaco e são elas: contração muscular, lesão do tegumento e alterações metabólicas. (CIOLI *et al*, 1995).

Os efeitos colaterais advindo da administração do praziquantel seguem e o mesmo caminho daqueles alcançados com a administração da oxamniquine. Sendo assim, a rejeição por parte de pacientes acometidos com a doença pode se tornar alta, especialmente em casos onde há sucessivas infecções e intervenções como o tratamento populacional em massa. O ensaio realizado por REZENDE (1985) demonstra que os efeitos adversos e a atividade de cura são equivalentes para o praziquantel e oxamniquine, no entanto, o último possui um mercado restrito para *S. mansoni*, enquanto o praziquantel se destaca pelo seu baixo custo e grande mercado consumidor. Esse último é considerado como um fármaco de primeira escolha orientado pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2018).

2.6 PERSPECTIVAS DE NOVOS FÁRMACOS

De modo geral, o ponto de partida para o desenvolvimento de fármaco é a identificação de uma molécula inicialmente ativa (hit) que podem ser geradas de forma empírica ou métodos racionais. Após a obtenção das moléculas promissoras a geração de molécula protótipo deve

prosseguir. Este processo envolve etapas multidisciplinares até chegar ao caminho longo e dispendioso do desenvolvimento de novos fármacos e etapas de desenvolvimento clínico. Diante de tal direcionamento deve-se então traçar sítios específicos para o tratamento da esquistossomose como forma de considerar esses alvos como oportunidades de alvo terapêutico (GREENBERG, 2005).

O sistema neuromuscular do verme seria um alvo particularmente atrativo para substâncias anti-*S.mansoni* tendo conhecimento da fisiologia da neurotransmissão e contração neste parasito, pois este possui uma semelhança qualitativa da atividade motora dos mamíferos. Sendo assim, uma análise mais detalhada dos receptores envolvidos na via GABAérgica do *S. mansoni* (via responsável pela regulação do tônus muscular) os tornaram possíveis alvos de agentes esquistossomicidas. (MENDONÇA-SILVA *et al*, 2004).

O receptor benzodiazepínico, pertencente à via gabaérgica, tornou-se um importante alvo molecular depois que foi demonstrado um efeito esquistossomicida semelhante ao efeito produzido pelo PZQ por parte do fármaco 3-metil clonazepam que se ligava a sítios específicos no verme e possuía atividade contrativa. (PAX, BENNETT; FETTERER, 1978). O fato de se ter evidenciado sítios de ligações específicas para o flunitrazepam para vermes de *S. mansoni*, com perfil diferente do receptor benzodiazepínico de mamífero, torna-se um objeto de estudo interessante para moléculas promissoras na atividade esquistossomicida.

Os receptores de glutamato e nicotina também foram objeto de interesse de um estudo em relação ao tipo de paralisia causada pela interação de inibidores com esses receptores. O receptor nicotínico, quando inibido, produziu uma paralisia flácida e uma diminuição intensa da motilidade do verme. Situação tal que foi invertida após a retirada do inibidor da superfície do verme. Com isso, a ação de moléculas que atuem em receptores nicotínicos podem se tornar interessantes para o conhecimento da atividade anti-*S.mansoni* de inibidores nicotínicos.

Na busca por novos fármacos, deve-se considerar que possuímos muitos caminhos que podem chegar no mesmo fim, o reestabelecimento da saúde. São elas: fármacos que atuem de maneira profilática, ou seja, atuação nas formas larvais do verme, fármacos supressores, que acabem com a postura de ovos pelas fêmeas, e drogas curativas que mate todo o verme adulto, interrompendo o ciclo. Uma quarta abordagem também pode ser alcançada através do fármaco que atue na reversão da fibrose e conseqüentemente das lesões já causadas pela esquistossomose.

Não é conveniente que haja apenas um fármaco para o tratamento de uma doença endêmica em tantas partes do mundo. A busca por novos esforços para descobrimento de novas moléculas com potencial anti-*S. mansoni* é urgente. Todos os esforços de pesquisadores,

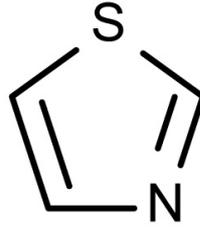
professores, formadores de opinião e políticos devem ser efetivo no sentido de despertar em autoridades responsáveis a necessidade imediata de investimentos no fornecimento de melhores condições sanitárias e pesquisa de novos fármacos que enfraqueça a endemia esquistossomótica presente no Brasil.

2.7 FTALIMIDA

O grupo farmacofórico ftalimida é composto por um anel bicíclico, aromático e heterocíclico. A literatura atribui a esse núcleo uma diversidade de atividades biológicas, como: anti-inflamatória (ALANAZI *et al*, 2015; LETICIA *et al*, 2012), antimicrobiana (AKGUN *et al*, 2012; LAMIE *et al*, 2015), analgésica (ALANAZI *et al*, 2015), anticâncer (VERISSIMO *et al*, 2015; MICHEL *et al*, 2015) e antiparasitária (SIGNH *et al*, 2015). Além de estar presente na lista do National Health Institute (NHI, USA) como uma das 40 estruturas farmacofóricas mais promissoras para o desenvolvimento de fármacos antitumorais e imunomodulatórios (GOMES, 2012). Diante a diversidade de atividades promovidas pelo grupo ftalimida, o mesmo se elege como um importante protótipo para a síntese orgânica e bastante vantajoso para possíveis novos fármacos.

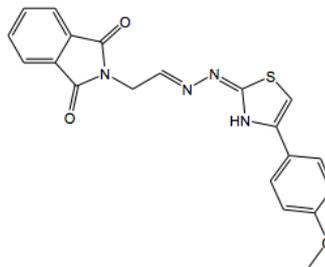
2.8 TIAZÓIS

Essa classe de compostos é constituída de um heterociclo aromático de 5 membros (Figura 4) substituído nas posições 1 e 3 com enxofre e nitrogênio, respectivamente. Encontrado como subunidade de inúmeras moléculas biologicamente ativas, sejam elas naturais ou sintéticas, o anel aromático despertou o interesse de químicos medicinais devido ao seu amplo espectro de ações já descritas na literatura. As atividades antimicrobiana (BONDOCK *et al*, 2007), anti-inflamatória (HOLLA *et al*, 2003), inibidores da MAO (F. CHIMENTI *et al*, 2007), anticâncer (AL-OMARY *et al*, 2012.) antituberculose (TURAN-ZITOUNI *et al*, 2008.) anti-*T.cruzi* (GOMES *et al*, 2016) são conhecidas na literatura.

Figura 4 - Estrutura Química do Tiazol

Fonte: A autora (2018)

Mediante o vasto campo de atuação do tiazol e a escassez de dados na literatura sobre a ação de tiazóis anti-*S. mansoni*, Santiago *et al* em 2014 elaborou um screening analisando ftalimido-tiazóis frente a vermes adultos do *S. mansoni*. No referido trabalho identificou-se derivados tiazólicos com potente atividade esquistossomicidas, onde o principal protótipo é o LpQM-45 (figura 5). A molécula causou alterações ultraestruturais significativas, com a destruição do tegumento em vermes adultos. Portanto, devido à semelhança estrutural dos nossos compostos com o LpQM-45, decidiu-se avaliar as propriedades farmacológicas de novos ftalimido-tiazóis.

Figura 5 - Estrutura química do LpQM-45

Fonte: Da autora (2018)

3 METODOLOGIA

Esse tópico está dividido em subtópicos para melhor compreensão do leitor sobre o processo de pesquisa.

3.1 MOLÉCULAS

Com base nos compostos promissores testados por Santiago *et al* (2014), foram selecionados nove novos compostos ftalimido-tiazóis com substituintes diversos para constituir uma relação estrutura atividade frente as formas adultas e larvais do *S. mansoni*. Os compostos foram produzidos pelo Laboratório de Planejamento em Química Medicinal da Universidade Federal de Pernambuco sob a direção da Doutora Ana Cristina Lima Leite e testados no Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular no Instituto Aggeu Magalhães (IAM) – Pernambuco sob a direção da Doutora Sheilla Andrade de Oliveira.

3.2 INFECÇÃO PELO *S. MANSONI*

Com a finalidade da obtenção de vermes adultos de *S. mansoni*, foi realizada uma infecção por via percutânea de animais de 25-20 dias de idade. Após o recebimento dos camundongos albinos suíços (*Mus musculus*), os mesmos foram submetidos à infecção experimental, utilizando para cada camundongo cerca de 120 cercárias da Cepa LE – Belo Horizonte oriundas de *Biomphalaria glabrata*, criados no laboratório de malacologia (IAM) para teste *in vitro*. Para os testes *in vivo* foram utilizados camundongos isogênicos Balb/C que foram infectados por 80 cercárias da mesma cepa.

Para realizar a infecção, os animais foram colocados em uma caixa de plástico e coberto com uma grade contendo uma quantidade mínima de água morna, para que eles eliminassem as fezes e urina. Em seguida, os animais foram colocados em frascos de vidro individuais de boca larga, com tampas aeradas (furadas), contendo água suficiente para cobrir as patas traseiras e a cauda. Foram adicionados, então, as cercárias previamente quantificados dentro dos frascos onde estavam os camundongos, ficando os animais em contato com o inoculo em torno de 1h, sob fonte de luz direta, facilitando a penetração do patógeno.

Após 45 dias de infecção dos camundongos, foram realizados exames parasitológicos das fezes para avaliar a positividade da infecção como descrito por HOFFMAN e colaboradores em 1934.

3.3 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE VERMES ADULTOS E LARVAIS DE *S. MANSONI* FRENTE AOS COMPOSTOS.

Todos os animais do estudo foram submetido à anestesia antes do procedimento e após a verificação de perda dos reflexos digitais e caudais, seguiu-se da seguinte maneira: Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal (IP) com Tiopental (50 mg/Kg) e então foi realizada uma incisão próxima aos órgãos genitais indo até a caixa torácica com o auxílio de uma tesoura oftálmica (fina/fina) + pinça de dissecação. Cortou-se a veia portal e perfundiou-se o ventrículo esquerdo com solução de perfusão (NaCl 0,85% e Citrato de Sódio 0,015%), para retirada dos vermes das veias mesentéricas. Os parasitos foram removidos dos camundongos infectados com alta carga parasitária (120 cercárias), e em seguida lavados em meio RPMI-1640 completo. Após a lavagem os vermes foram transferidos para placas de cultura de tecidos contendo 2mL desse meio. Cada poço recebeu quatro vermes, sendo o primeiro poço portador de 4 machos, o segundo poço portador de 4 fêmeas e o terceiro poço portador de 2 machos e 2 fêmeas, e em seguida foram incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após um período de 2 horas de adaptação, os derivados sintetizados foram adicionados nas concentrações de 100 µg/mL, 80µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL e 5 µg/mL. Os parasitos foram mantidos em cultura por 6 dias sendo monitorados a cada 24 horas para avaliação da atividade motora, oviposição e da taxa de mortalidade no microscópio invertido.

3.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DE VERMES ADULTOS DO *S. MANSONI* TRATADOS COM OS COMPOSTOS.

Os compostos que obtiveram atividade esquistossomicida significativa foram incubados com vermes adultos para um novo ensaio *in vitro*, onde foram avaliados quanto as alterações ultraestruturais causadas nos parasitos na concentração de EC50. Para isso os vermes tratados com os compostos foram coletados com 24h, e 48h após a incubação e submetidos à análise por microscopia eletrônica de varredura.

Foram fixados overnight à temperatura ambiente com 2,5% de glutaraldeído, formaldeído a 4%, e tampão de cacodilato 0,1 M com pH 6,8. Eles foram, em seguida, pós-fixados em 2% de tetróxido de ósmio (OsO₄) num tampão de cacodilato 0,1 M com pH 6,8 durante 60 min na ausência da luz, à temperatura ambiente. Os próximos passos foram o de lavagem e desidratação em uma série de etanol graduada por quinze minutos cada. A secagem

do material foi realizada no ponto crítico, utilizando CO₂ líquido. Os vermes foram revestidos com ouro coloidal examinados no microscópio de varredura JEOL-5600LV.

3.5 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE VERMES DE *S. MANSONI* NA FORMA LARVAL FRENTE AOS COMPOSTOS.

As formas larvais transformadas de *S. mansoni* foram obtidos mecanicamente através da técnica descrita por Ramalho-Pinto *et al*, (1974). Os esquistossômulos foram cultivados em meio RPMI 1640, contendo antibiótico e suplementado com 10% de soro fetal de bovino a 37°C numa atmosfera de CO₂ a 5% (BASCH, 1981). Essa forma do parasito foi cultivada até o 3º dia, onde se obtém esquistossômulos correspondentes aos observados na pele até o da fase pulmonar de indivíduos infetados (MORAES, 2011). Para ensaios *in vitro* de compostos protótipos, foram utilizados esquistossômulos obtidos no dia anterior ao ensaio e conservados em meio de cultura em condições semelhantes aos vermes adultos. Os esquistossômulos foram incubados em placa de 96 poços (aproximadamente 100 parasitos por poço) contendo meio RPMI 1640 completo. Os compostos foram adicionados em sete concentrações, variando de 2,5 µg/mL a 100 µg/mL. Como controle negativo foi utilizado o DMSO a 1,6% (solvente utilizado para solubilizar as moléculas), e como controle positivo foi utilizado o praziquantel na concentração de 3. µg/mL. As placas de cultura foram monitoradas a cada 24 horas durante 3 dias, utilizando um microscópio invertido. A morte do parasito foi definida na ausência de movimento por pelo menos 1 minuto de exame (MORAES, 2011). O estudo foi feito em triplicata e a atividade medida por cálculo da percentagem do número de esquistossômulos mortos.

3.6 PREPARAÇÃO DA SUSPENSÃO PARA O ENSAIO *IN VIVO*

Para aumentar a solubilidade dos compostos em meio aquoso, a molécula mais promissora testada *in vitro* (As-13) foi preparada em dispersão sólida. Para isso foi utilizado o cremophor El, composto comercial adquirido na Sigma Aldrich e constituído de diversos polímeros que servem de tensoativos na formação da suspensão. Diversas concentrações foram testadas e verificou-se a suspenso ideal de 5% de cremophor e 95% de água para administração via gavagem.

3.7 AVALIAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE *IN VIVO* DE VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI* FRENTE AOS COMPOSTOS MAIS PROMISSORES.

O tratamento com As-13 foi realizado nos camundongos após 45 dias de infecção, onde a doença já estava estabilizada e já havia deposição de ovos.

Grupos experimentais: composto por 40 camundongos submetidos à infecção experimental pelo *S. mansoni* (80 cercárias). Após a infecção, os animais serão divididos em quatro grupos:

- a) Grupo tratado apenas com o veículo utilizado para solubilizar o composto protótipo (10 animais)
- b) Grupo tratado com o praziquantel na dose de 400mg/kg (10 animais)
- c) Grupo tratado com o derivado As-13 na dose de 200mg/kg por 5 dias (10 animais)
- d) Grupo tratado com o derivado As-13 na dose de 400mg/kg em dose única (10 animais)

Todos os camundongos foram mantidos no Biotério de Experimentação do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ), em condições padronizadas de temperatura (23°C), exaustão de ar e luminosidade, recebendo água e alimentação *ad libitum* com dieta padrão comercial para camundongos (NuvilabCR1, Nuvital, Curitiba, PR). Após 45 dias de infecção, a molécula preparada em suspensão com Cremophor EL foi administrada por via oro-gástrica. Após o procedimento, os animais foram recolocados em suas respectivas caixas e monitorados durante todo o período de duração do experimento. Após 15 dias do tratamento dos compostos, os animais foram submetidos à eutanásia para a determinação do número de vermes residuais e coleta de fragmentos de tecidos para avaliação parasitológica e morfológica.

3.8 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE PARASITOLÓGICA DO AS-13

A avaliação parasitológica foi realizada com as metodologias relatadas nos tópicos seguintes.

3.8.1 Obtenção e contagem dos vermes adultos

Os parasitos foram obtidos através de perfusão do sistema porta-mesentérico e coleta direta no mesentério; como descrito no item “Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de vermes adultos e imaturos de *S. mansoni* frente aos compostos.

3.8.2 Contagem dos ovos do Fígado e no intestino

Fragmentos de fígado e do intestino foram retirados e digeridos em hidróxido de potássio (KOH) a 4% (CHEEVER et al, 1970). Posteriormente foram contabilizados e submetidos à análise estatística.

3.8.3 Oograma

Três fragmentos da porção distal do intestino medindo aproximadamente 1cm, foram comprimidos entre lâmina e lamínula e analisados em microscópio para realização da classificação dos ovos. Para cada fragmento 100 ovos foram contados e classificados de acordo com os seus estádios de desenvolvimento. Os ovos foram classificados em ovos imaturos viáveis (de 1º a 4º estágio), ovos maduros viáveis, e ovos inviáveis (calcificados, com miracídio retraído, semi-transparentes) segundo PELLEGRINO et al., 1965

3.8.4 Avaliação Morfométrica

As amostras de fígado de cada camundongo foram fixadas em solução de formalina a 10%, incluídas em blocos de parafina, seccionadas e coradas com picro-sírius vermelho. Foram selecionados dez campos microscópicos de cortes histológicos do fígado (5 µm), que apresentaram grande produção de tecido conjuntivo, e o tecido colágeno foi destacado e adquirido como uma porcentagem usando o Sistema de Análise e Análise LEICA Qwin 2.6 (Leica Cambridge, Inglaterra). O resultado da medição de cada animal foi a porcentagem média desses dez campos microscópicos, e o resultado final foi a porcentagem média por grupo. O

sistema foi calibrado para uma lente de ampliação de 10x usando um microscópio Leica DM LB2

3.8.5 Ensaio de hidroxiprolina

As amostras de fígado foram imersas em HCl 6N a aproximadamente 120 ° C por 18 h, seguido de filtração. A concentração de hidroxiprolina foi determinada por um ensaio colorimétrico a 558 nm, como previamente descrito por Bergman e Loxley e expresso em nmol / g de fígado.

3.9 Análise estatística

Os dados quantitativos foram submetidos a um teste de normalidade (Shapiro-Wilk). As diferenças foram avaliadas usando o teste One-way ANOVA com post-hoc Turkey e Two-way ANOVA para análise paramétrica. As análises estatísticas foram realizadas com o Software Prism (versão 5.0; GraphPad Software, San Diego, CA, Estados Unidos). Um valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Os dados foram expressos como valores médios (média \pm EPM).

3.10 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais do Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Protocolado sob nº 79/2015. (Anexo A)

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esse ponto foi dividido em subtópicos para melhor compreensão dos resultados.

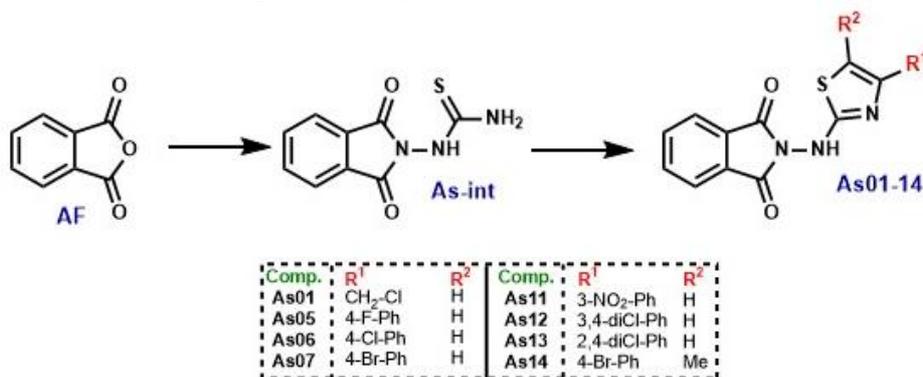
4.1 SELEÇÃO DE NOVOS FTALIMIDO-TIAZÓIS PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*S.MANSONI*

As moléculas ftalimido-tiazóis que foram submetidos à avaliação do potencial efeito profilático e curativo da doença da esquistossomose foram resultantes de modificações molecular através de técnicas de hibridação molecular e bioisosterismo. Essas estratégias permitiram um vasto estudo da relação estrutura-atividade, sendo capaz de nos oferecer um composto protótipo de alto potencial esquistossomicida, como As-13.

No ano de 2014, Santiago e colaboradores publicaram uma triagem de inéditos novas moléculas que foram testados para a atividade antiparasitária do *S. mansoni*. No referido trabalho um grupo de moléculas possuidoras de diferentes grupos farmacofóricos, incluindo o grupo tiazol demonstrou uma promissora atividade contra a esquistossomose e por isso houve interesse na descoberta de novos hits moleculares com potencial antiparasitário. Buscando um aprofundamento da relação estrutura atividade, alguns compostos heterocíclicos foram planejados e sintetizados com ajuda da estratégia de hibridação molecular para atender essa demanda.

Sendo assim, uma série de 1 derivado da tiossemicarbazona e 9 moléculas tiazólicas cuja as estruturas estão na figura 6 foram enviadas para o Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular (LIBM) no Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ- PE para a análise das atividades anti-*Schistosoma mansoni* na forma larval e adulta.

Figura 6 - Compostos ftalimido-tiazóis em estudo



Fonte: A autora (2018)

4.2 DETERMINAÇÃO DE CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICA DAS MOLÉCULAS

Os estudos *in silico* estão sendo empregados para realização de um processo preliminar na determinação de características físico-químicas a fim de economizar tempo e delinear melhor o estudo de novas moléculas, essas propriedades são importantes para a avaliação teórica da biodisponibilidade oral de um composto e atende ao uso de métodos alternativos na experimentação animal.

Lipinski foi um dos primeiros a definir um conjunto de quatro parâmetros capazes de identificar compostos com boa absorção e permeabilidade sendo nomeada essas propriedades como “regra dos cinco de Lipinski”. (LIPINSKI et al, 1996)

Através de análises de um banco de dados de fármacos comerciais oralmente ativos, observou-se que uma boa absorção e permeação são mais comuns quando o Log P calculado for menor ou igual a 5; o peso molecular, menor ou igual a 500 Da; o número de grupos doadores de ligação de hidrogênio, menor ou igual a 5; e o número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio, menor ou igual a 10. Essa regra recebeu a denominação de “Regra dos cinco”, pois todos os valores se limitam a números iguais ou múltiplos de 5. Assim, a regra é satisfeita quando pelo três dos quatro parâmetros são satisfeitos.

Existem vários programas, sites e sistemas para a avaliação das propriedades físico-químicas dos nossos compostos propostos. Um dos sistemas de informática bastante conhecido é o Chemicalize, ferramenta que oferece todos os dados supracitados referentes à regra de Lipinski, assim como nomes e identificadores, cálculos estruturais e outras propriedades básicas. As ferramentas chemicalize são de escritas em Java e, portanto, passíveis de ser utilizado em qualquer plataforma de computador. Para todos os nove compostos da série, foram realizados os estudos *in silico* e mediante os resultados obtidos, todas as moléculas se classificaram dentro da regra de Lipinski e seguiram aptas para a avaliação *in vitro* frente às formas larvais e adultas do *S. mansoni*.

Tabela 1- Resultado dos cálculos realizados no chemicalize

Compostos	MM (<500Da)	DLH (<5)	ALH (<10)	LogP (<5)	Lipinski
As-Int	221.245	2	2	0.66	SIM
As-01	293.729	1	4	2.81	
As-05	339.344	1	4	4.31	
As-06	355.798	1	4	4.78	
As-07	400.249	1	4	4.94	
As-11	366.351	1	5	4.11	
As-12	390.243	1	4	5.38	
As-13	390.243	1	4	5.38	
As-14	414.276	1	4	5.59	
PZQ	312.406	0	4	2.30	

Fonte: Dados da pesquisa (2018)

A regra dos 5 de Lipinski cita quatro pontos. São eles MM (massa molecular), DLH (doadores de ligações de hidrogênio), ALH (aceptores de ligação de hidrogênio) e logP.

4.3 EFEITO ESQUISTOSSOMICIDA DOS DERIVADOS FTALÍMIDO-TIAZÓIS NA CONCENTRAÇÃO DE 100 µG/ML SOBRE VERMES ADULTOS DE *S. MANSONI*.

Os nove compostos foram submetidos aos testes *in vitro* para avaliar a atividade esquistossomicida de cada um deles na forma adulta. Após coletados, os vermes adultos de *S. mansoni* foram colocados em contato com os compostos e em seguida analisados o parâmetro da mortalidade numa concentração fixa de 100 µg/mL, a fim de verificar se eles possuem alguma atividade na maior concentração testada. As moléculas que produziram efeitos esquistossomicidas foram submetidas ao teste *in vitro* em outras concentrações. Aqueles que mesmo em doses altas não diminuíram ou inativaram a movimentação do verme adultos foram retidos nesta primeira triagem (Gráfico 1). Os derivados tiazólicos que demonstraram atividade esquistossomicida acima de 50% foram melhor avaliados utilizando um gradiente de concentrações, sendo avaliados quanto as alterações na motilidade, no tegumento e na oviposição.

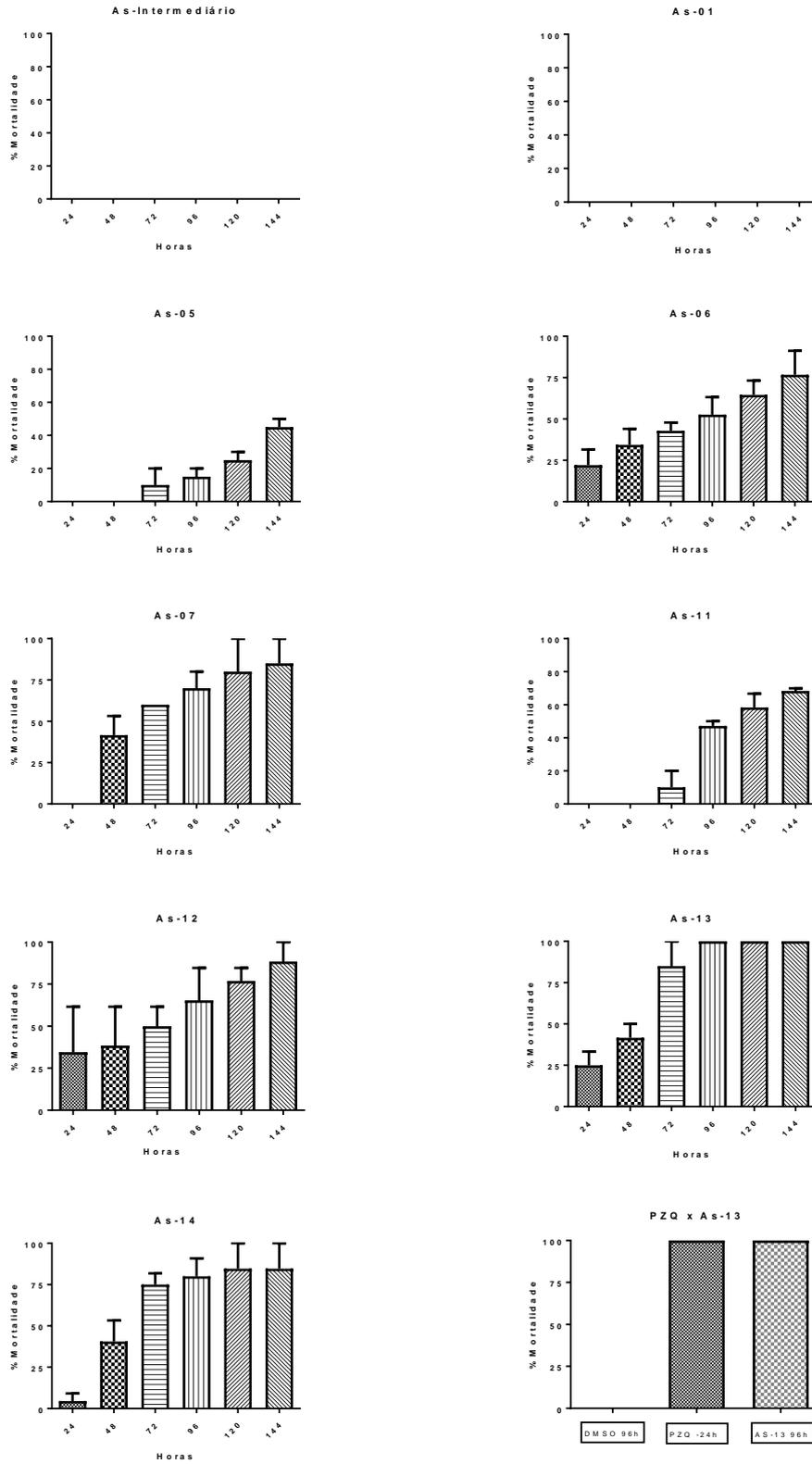
A avaliação dos compostos testados em 100 µg/mL demonstrou que cerca de 78% dos compostos apresentaram atividade esquistossomicida. Destes, 4 tiveram atividade superior a 60% no tempo de 96 horas (As-06, As-12, As-13 e As-14) e o As-13 foi capaz de induzir 100% de mortalidade dos parasitos no mesmo tempo. O PZQ provocou 100% de mortalidade dentro das primeiras 24h e com o controle negativo os vermes permaneceram ativos até o último período do experimento.

Sobre os compostos *para* substituídos com halogênios (flúor, cloro e bromo) nota-se que à medida que aumenta-se o raio atômico do substituinte, aumenta-se a atividade do composto, sendo o mais promissor aquele que possui o átomo de cloro dissubstituído. Com a finalidade de analisar mais detalhadamente a atividade de compostos *para*-bromo substituídos, acrescentou-se uma metila no carbono 5 (C5) do tiazol a fim de aumentar a lipofilia do composto As-07. O resultado demonstrado pelo As-14 foi semelhante ao resultado encontrado para o As-07, possuindo o último leve tendência ao aumento da atividade esquistossomicida.

Quando a substituição é na posição meta por um forte retirador de elétrons (As-11), ocorre um decréscimo significativo na atividade do composto e portanto, não promissora. Para os compostos As-12 e As-13, a dissubstituição de átomos de cloro foi totalmente benéfica e mostrou-se promissora. Sendo o composto As-13 a mais promitente molécula dissubstituída da série testada, observou-se que a *orto-para* dissubstituição é favorável à atividade *S.mansoni*.

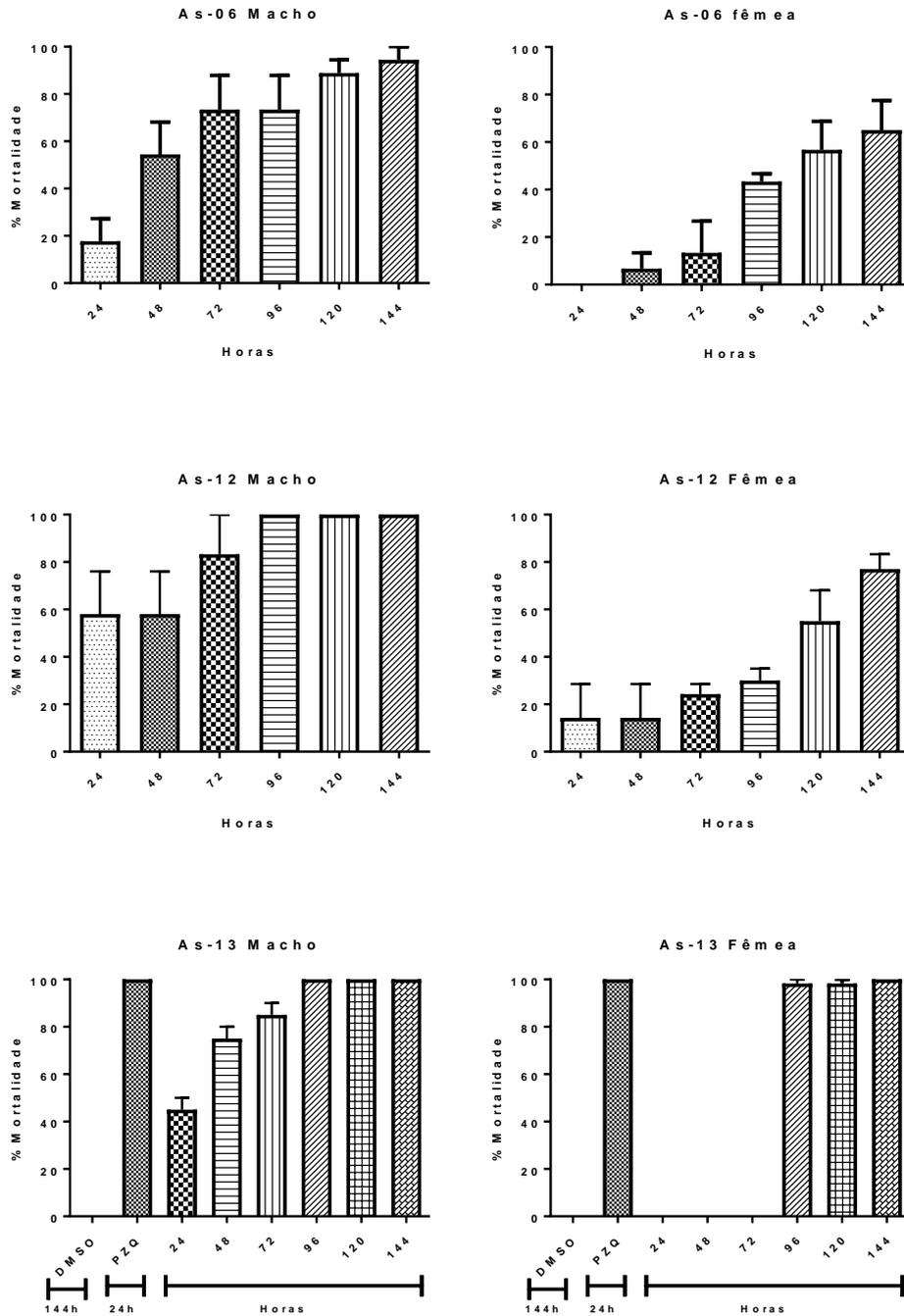
Os compostos As-06, As-12 e As-13 foram testados frente aos vermes adultos macho e fêmea separadamente e observou-se que os compostos possuem afinidade pelo verme adulto macho, sendo assim, a mortalidade de machos é muito mais elevada que a mortalidade de fêmeas no mesmo período de tempo. Isso é possível observar com o gráfico 2 abaixo.

Gráfico 1 - Gráfico de mortalidade de vermes adultos de *S. mansoni* em porcentagem na dose de 100µg/mL



Fonte: Dados da pesquisa (2018)

Gráfico 2 - Gráfico de mortalidade dos vermes machos e fêmeas na presença dos compostos As-06, As-12 e As-13 em porcentagem na dose de 100µg/mL



Fonte: Dados da pesquisa (2018)

4.4 EFEITO DOS CANDIDATOS FTALIMIDO-TIAZÓIS NAS CONCENTRAÇÕES DE 5 µg/mL A 100 µg/mL.

As moléculas mais ativas na triagem inicial, e que revelaram atividade esquistossomicida foram melhores avaliados utilizando um gradiente de concentrações. A tabela 2 identifica as moléculas testadas e os valores de mortalidade de vermes adultos quando incubados com as moléculas propostas.

Tabela 2 - Efeito *in vitro* dos derivados ftalimido-tiazóis contra os vermes adultos de *S. mansoni*

Composto	Tempo (h)	Mortalidade (%) em µg/mL					
		100	80	40	20	10	5
As-05	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	10	9.09	6	0	0	0
	96	15	12.2	11.1	0	0	0
	120	25	20	11.1	0	0	0
	144	45	20	11.1	0	0	0
As-06	24	22.1	20.1	20.1	12.1	0	0
	48	34.3	34.3	31.3	26.9	0	0
	72	42.9	37.7	33.3	29.5	0	0
	96	52.6	52.5	38.1	29.5	0	0
	120	64.5	52.5	48.1	29.5	0	0
	144	75	59.2	50.5	50	0	0
As-07	24	0	0	0	0	0	0
	48	41.5	10	20	0	0	0
	72	80	20	33.3	0	0	0
	96	80	20	45.4	0	0	0
	120	80	20	55	0	0	0
	144	85	20	55	0	0	0
As-12	24	34.6	23.2	17.5	11.9	0	0
	48	38.4	47.4	45.4	32.5	0	0
	72	50	75.6	46.7	32.5	0	0
	96	65.4	75.6	46.7	32.5	0	0
	120	76.9	83.3	46.7	32.5	0	0
	144	94.2	83.3	46.7	32.5	0	0
As-13	24	25	20.8	16.7	10.5	0	0
	48	66.7	60.4	54.2	25	0	0
	72	75	75	75	50	0	0
	96	100	90.3	83.3	50	0	0
	120	100	91.7	91.7	50	0	0
	144	100	100	92.3	52.6	0	0
As-14	24	4.5	0	0	0	0	0
	48	55	20	10	0	0	0

	72	75	33.3	15	0	0	0
	96	80	40	30	10	0	0
	120	85	50	43	15	0	0
	144	85	85	43	25	0	0
PZQ	24	100	100	100	100	100	100

Fonte: Dados da pesquisa (2018)

Tabela exibindo a porcentagem de mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* quando incubados com as concentrações de moléculas descritas acima nas colunas.

Os compostos propostos passaram por uma triagem na concentração máxima (100 µg/mL) e para todos os compostos que apresentaram atividade esquistossomicida superior a 40% foram avaliados nas concentrações que variaram de 100 µg/mL a 5 µg/mL. Esse método de exclusão visa uma diminuição na quantidade de vermes utilizados nos testes e consequente diminuição da quantidade de camundongos como hospedeiro intermediário.

A tabela 2 demonstra que o composto As-13 apresentou atividade de 100% de mortalidade em 96 horas na concentração de 100 µg/mL e que na concentração de 80 µg/mL causou a morte de 100% dos parasitos em 144 horas de incubação. No entanto, o As-13 não demonstra nenhuma atividade nas concentrações iguais ou inferiores a 10 µg/mL.

Sobre as moléculas As-07 e As-14 pôde-se verificar o aumento da atividade anti-parasitária do segundo composto em relação ao primeiro. Com a adição de uma metila na posição de C5 do anel tiazólico conseguiu-se uma mortalidade de 25% dos vermes adultos de *S.mansoni* até mesmo na concentração de 20 µg/mL no tempo de 144 horas.

O composto As-06, *para* substituído com cloro, demonstrou uma atividade de quase 50% em uma concentração de 20 µg/mL em 144 horas, no entanto, sua atividade declina bruscamente quando a concentração de composto diminui para 10 µg/mL e passa a não produzir atividade anti-*S.mansoni* nessa concentração.

Quanto aos compostos dissustituídos com cloro, As-12 e As-13, a mortalidade promovida pela molécula é bem superior à mortalidade promovida pelo As-06, cloro-*para* substituído e com isso observou-se que a dissustituição torna a quimioterapia mais eficaz e promissora. Portanto, os compostos protótipos para a série é o As-13 por causa de sua eficácia em baixas concentrações. Devido a essa característica o composto apresenta a menor concentração efetiva da série. Os resultados estão expostos na tabela 3. A citotoxicidade desses compostos em células de mamíferos J774 já estão publicadas por Aliança, 2017 e utilizou-se elas para fazer o índice de seletividade de nossos compostos.

Os compostos substituídos com halogênios são objetos de estudos dos químicos medicinais e tão frequentemente aparecem com promissora atividade em diversas áreas dos testes pré-clínicos. A ação desses compostos já estão na literatura como: anti-*T.cruzi* (GOMES

et al, 2016) e anti-tumoral (DA SANTANA; BARBOSA et al 2017; DOS SANTOS SILVA et al, 2017). Segundo Hernandez (2010) a presença de halogênios em compostos orgânicos proporciona uma gama de possíveis atividade.

Tabela 3- Atividade esquistossomocida *in vitro*, citotoxicidade e índice de seletividade

Código	CC ₅₀ (µM)*	EC ₅₀ (µM)	IS**
As-Inter	393.3 ± 7.3	ND	ND
As-1	1582.9 ± 36.8	ND	ND
As-05	206.5 ± 9.6	305.6	0.67
As-06	216.9 ± 3.9	87.9	2.46
As-07	201.9 ± 3.1	161.7	1.24
As-11	323.7 ± 13.0	249.9	1.29
As-12	157.9 ± 7.9	88.5	1.78
As-13	176.1 ± 15.8	50.6	3.48
As-14	125.6 ± 0.5	96.3	1.30

Fonte: Aliança et al, 2017

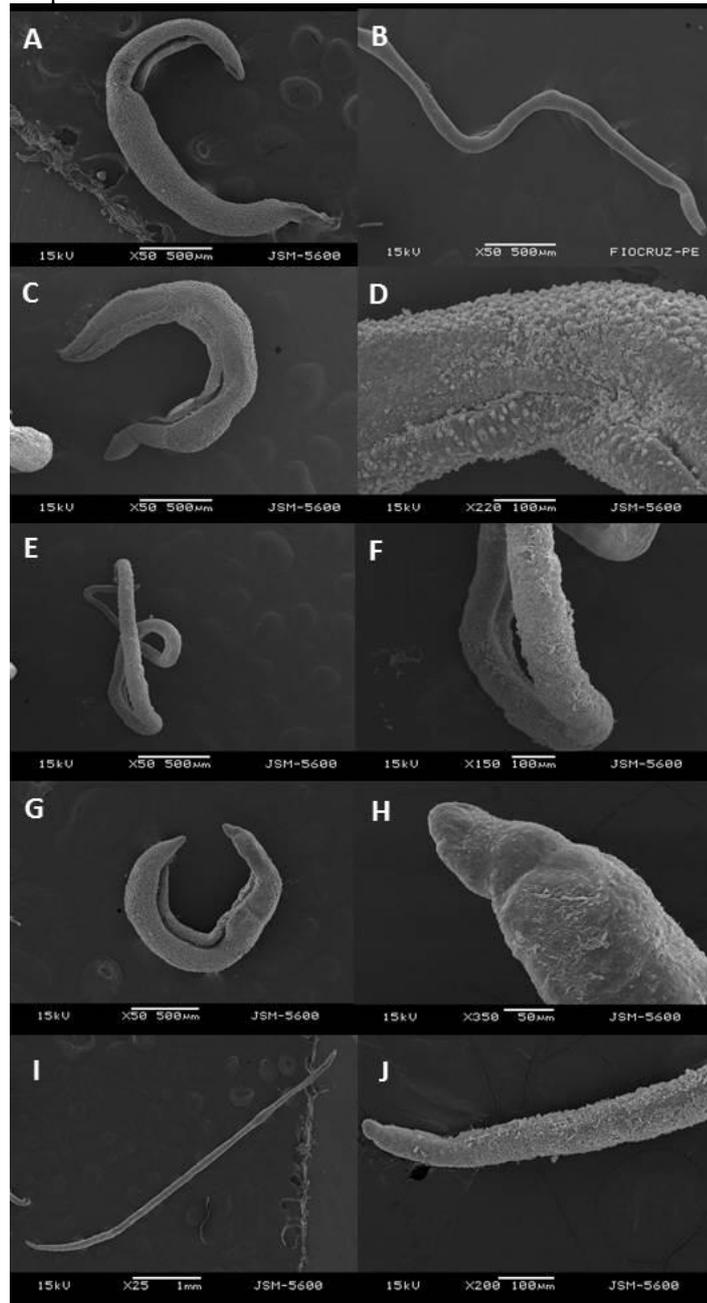
*A citotoxicidade foi determinada em esplenócitos após 48 horas incubados com os compostos.

** IS índice de seletividade foi calculado pela divisão entre IC₅₀ e EC₅₀. Os experimentos foram feitos em triplicata.

4.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

O tratamento com As-13 na concentração de EC₅₀ (50.6µM) no tempo de 96 horas e 120 horas promoveu um dano de grande extensão no tegumento do parasito. A observação ultraestrutural através de microscopia eletrônica de varredura demonstrou uma descamação intensa tanto no macho como na fêmea adulta de *S. mansoni* (**figura 7**). Quando os vermes adultos foram submetidos a 2x IC₅₀ (**figura 8**) observa-se uma maior degradação do tegumentos, formação de bolhas e deformação das ventosas.

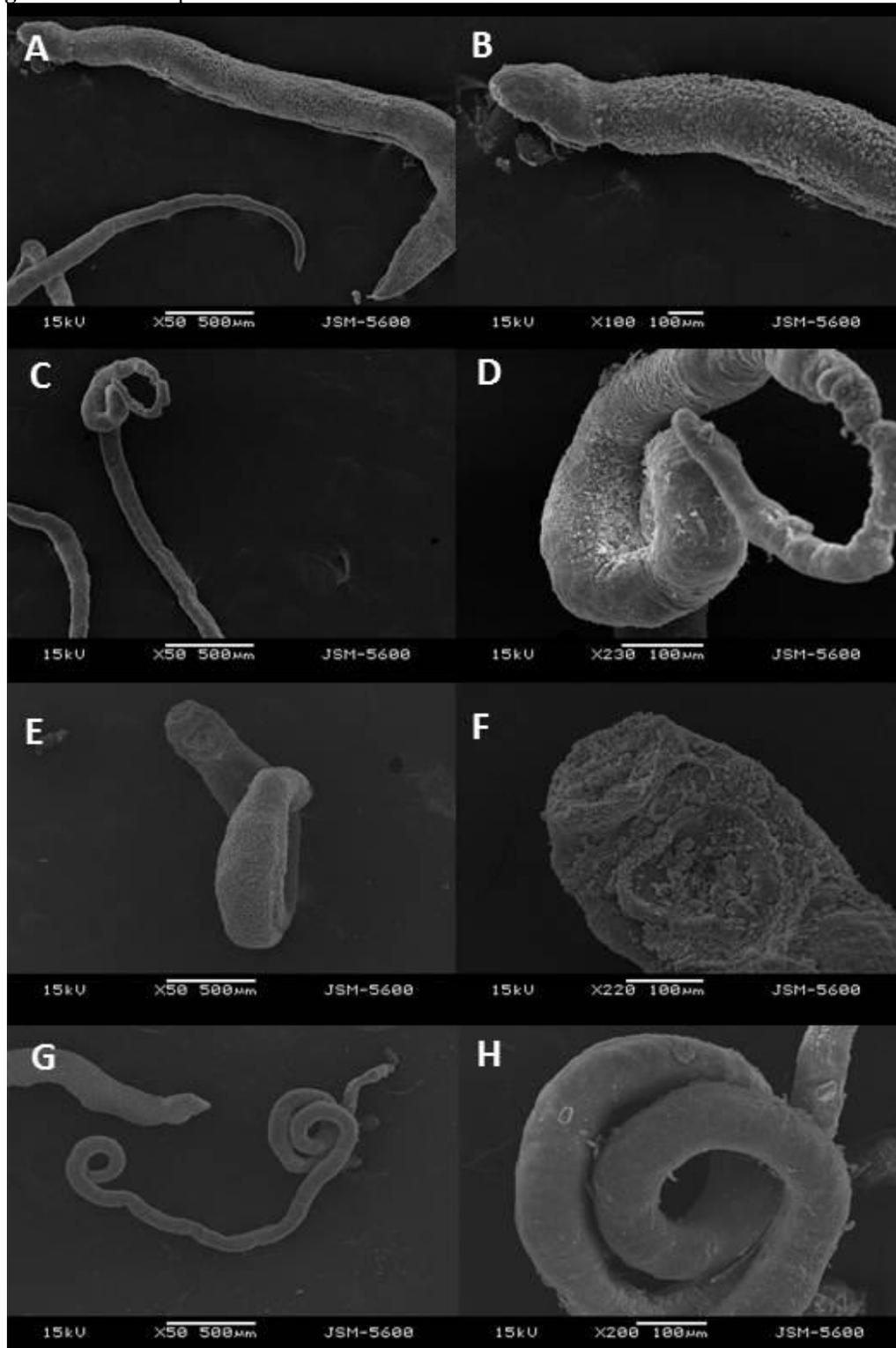
Figura 7 - Microscopia Eletrônica de Varredura dos vermes adultos submetido a 1xEC50 do As-13



Fonte: A autora (2018)

Eletromicrografia de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com o composto As-13 na concentração 1xEC50 (50.60 μ M) em diferentes tempos. A figura A e B são vermes em contato com o DMSO por 144 horas. A figura C e D, são vermes adultos machos em contato com o composto As-13 por 96 horas e a figura E e F são vermes adultos fêmeas nas mesmas condições. As figuras G e H são vermes adultos machos em contato com o composto As-13 após 120 horas e (I) e (J) são vermes fêmeas nas mesmas condições.

Figura 8 - Microscopia Eletrônica de Varredura dos vermes adultos submetido a 2xEC50 do As-13



Fonte: A autora (2018)

Eletromicrografia de vermes adultos de *S. mansoni* tratados com o composto As-13 na concentração 2xEC50 (101,2 μ M) em diferentes tempos. A figura A e B são vermes adultos machos em contato com o composto As-13 após 96 horas. As figuras C e D são vermes fêmeas em contato com o composto As-13 após 96 horas. (E) e (F) são vermes machos em contato com 2x EC50 após 120 horas, e (G) e (H) são vermes fêmeas nas mesmas condições.

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DE FTALIMIDO-TIAZÓIS EM FORMAS LARVAIS DO *S. MANSONI*

Os derivados tiazólicos que obtiveram melhor atividade contra vermes adultos do *S. mansoni* foram avaliados frente às formas larvais do parasito como exposto na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Mortalidade de esquistossômulos em porcentagem (%)

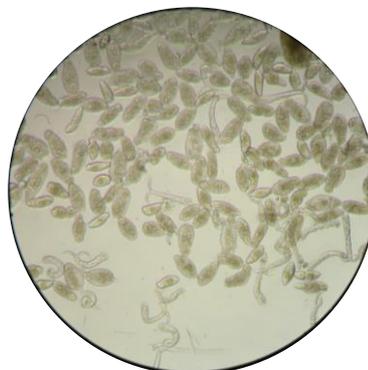
Composto	Tempo	Mortalidade (%) na concentração em µg/mL						
		100	80	40	20	10	5	2,5
As-06	24h	100	100	95	95	85	70	0
	48h	100	100	100	100	100	100	0
As-12	24h	100	100	95	90	70	70	70
	48h	100	100	100	100	100	100	100
As-13	24h	98	98	98	45	45	45	45
	48h	100	100	100	100	100	100	100
PZQ	24h	0	0	0	0	0	0	0
	48h	0	0	0	0	0	0	0

Fonte: Dados da pesquisa (2018)

Na triagem exploratória ficou nítida a promissora atividade dos compostos ftalimido-tiazóis frente às formas larvais do *S. mansoni*.

Para o composto As-06 e As-12 observou-se que após 24 horas os esquistossômulos estavam parados e sem nenhuma deformação em seu tegumento. A **figura 9** certifica o estado da forma externa dos esquistossômulos.

Figura 9 - Microscopia óptica dos esquistossômulos incubados com As-06.



Fonte: A autora (2018)

Imagem obtida em microscópio invertido no aumento de 20x para análise de motilidade e mortalidade de esquistossômulos. Presença de caudas e esquistossômulos.

O composto As-13 exibiu uma atividade de 98% nas doses superiores a 20µg/mL e produziu 45% de mortalidade dos esquistossômulos em doses igual ou inferior a 20µg/mL. No valor de EC50 dos compostos contra vermes adultos, os esquistossômulos alcançaram uma mortalidade de 45% nas primeiras 24 horas, no entanto, a partir das 48 horas, teriam uma mortalidade de 100%. Devido aos altos valores de mortalidade do verme na fase larval, até mesmo nas concentrações mais baixas testadas, não foi possível verificar o valor de EC50 dos nossos compostos contra a forma larval do *S. mansoni*.

O solvente álcool 70% foi utilizado com controle negativo e o meio como controle negativo. O praziquantel não exibiu atividade na concentração de 3µg/mL até mesmo no período máximo testado – 48horas.

4.7 PREPARAÇÃO DE SUSPENSÃO PARA O ENSAIO *IN VIVO*

Para a melhora da solubilidade do composto foi a utilização da cremophor. A mistura foi realizada entre o cremophor e o sólido e em seguida dispersos em água. Os tensoativos presentes no cremophor promoveram um efeito de suspensão do nosso composto com viscosidade necessária para a administração.

4.8 EFEITO DE AS-13 SOBRE A CARGA PARASITÁRIA DOS ANIMAIS TRATADOS APÓS 45 DIAS DE INFECÇÃO POR *S. MANSONI*

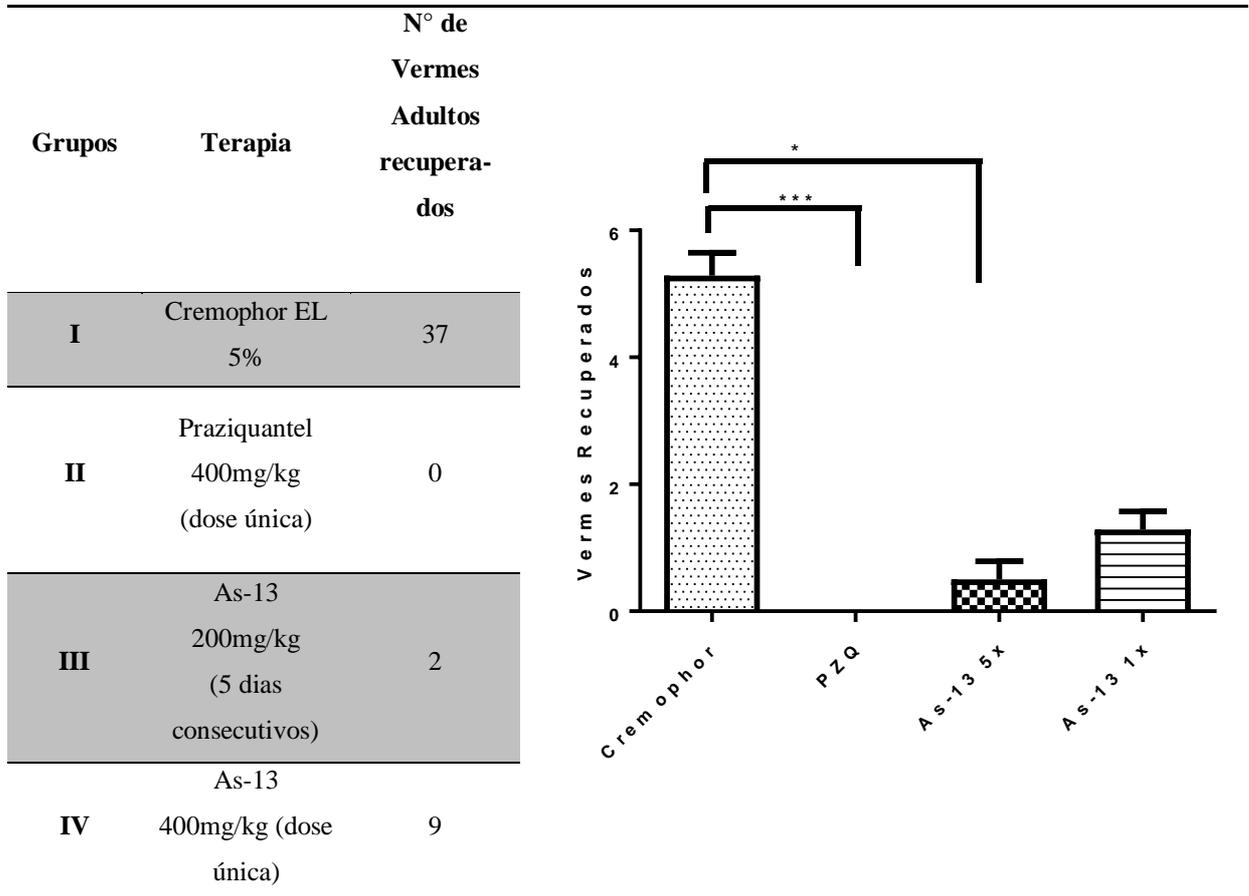
A avaliação terapêutica de As-13 em modelo murino teve como objetivo identificar o potencial de mortalidade do composto ftalimido-tiazol *in vivo*. Utilizou-se como controle positivo o praziquantel e como controle negativo o veículo de administração via gavagem. Os animais foram tratados em grupos de 10 e separados da seguinte maneira:

- e) Grupo tratado apenas com o veículo utilizado para solubilizar o composto protótipo (10 animais)
- f) Grupo tratado com o praziquantel na dose de 400mg/kg (10 animais)
- g) Grupo tratado com o derivado As-13 na dose de 200mg/kg por 5 dias (10 animais)
- h) Grupo tratado com o derivado As-13 na dose de 400mg/kg em dose única (10 animais)

Nesse estudo observou-se que a carga parasitária dos animais variavam conforme variação da dose e do protótipo administrado, sendo assim determinando uma dose-

dependência. O total de vermes encontrados no sistema porta-hepático, veias mesentéricas e órgãos estão expostos no gráfico 3. Quando submetidos à análise estatística, os dados demonstram que houve uma variação com $p < 0.01$.

Gráfico 3 - Relação entre o número de vermes adultos recuperados e a média do grupo.



Fonte: Dados da pesquisa (2018)

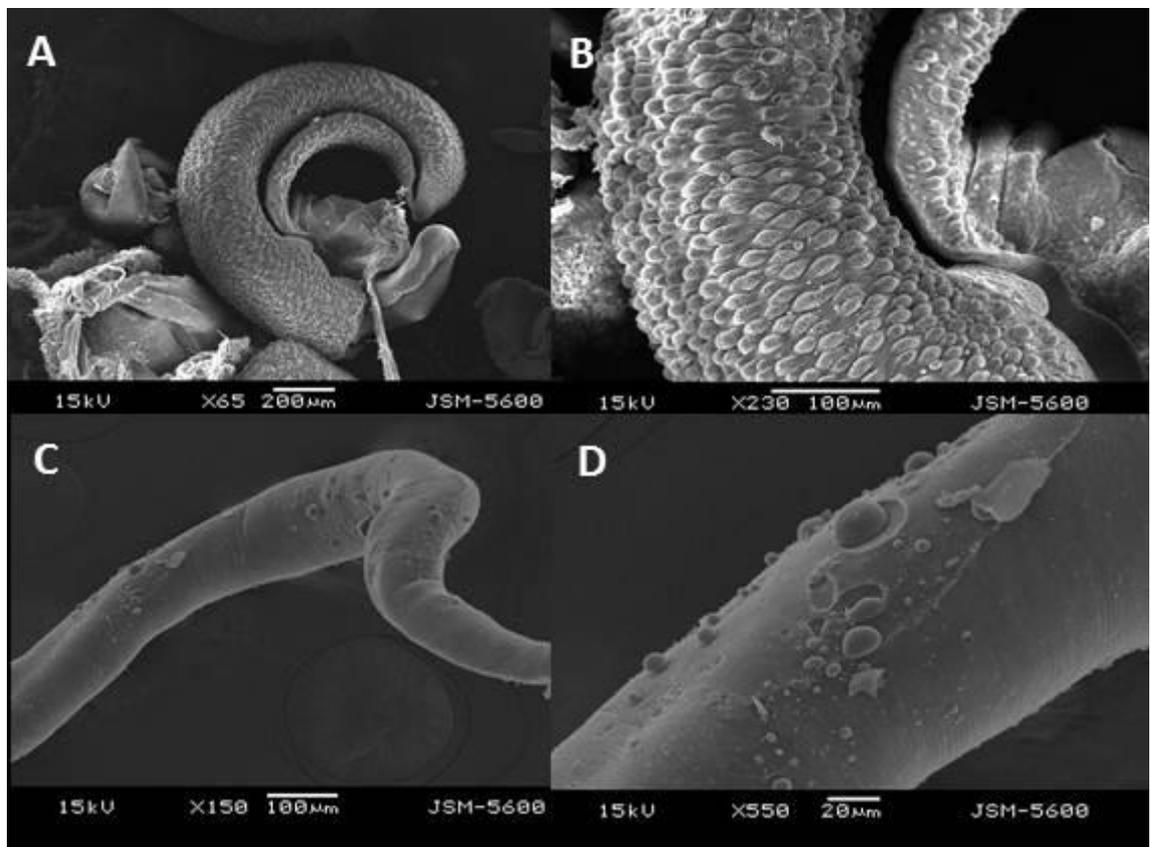
Esquema de terapia *in vivo* e número de vermes recuperados. O tratamento com 2m após 5 dias consecutivos de administração. A carga parasitária diminui em * $p < 0.05$ e *** $p < 0.01$

O grupo de dez animais tratado com cremophor El a 5% foi possível recuperar 37 vermes adultos, onde a média para cada animal ficou em torno de 5.2 vermes por animal. O grupo tratado com praziquantel, não houve nenhum verme recuperado. O grupo tratado com o composto protótipo variou de eficácia de acordo com a medida da frequência de administração. Quando os animais foram administrados 5 vezes consecutivas tiveram um número total de apenas 2 vermes, enquanto que no grupo onde os animais foram tratados de forma semelhante ao praziquantel, nove vermes foram recuperados. Isso indica que nosso composto possui uma dose-dependência. O estudo *in vivo* é cercado por barreiras farmacocinéticas e o resultado

dependente de frequência pode estar ligado à questões farmacocinéticas de metabolização e excreção do composto protótipo.

Os vermes recuperados através da perfusão foram coletados e submetidos a análise através da microscopia eletrônica de varredura (figura 10). Nas figuras obtidas podemos notar a degradação do tegumento tanto em vermes machos como em fêmeas. Nos machos há bolhas espalhadas pela superfície e degradação dos tubérculos. Nas vermes fêmeas, notou-se a presença de bolhas e descamação do tegumento, além da tumefação do corpo do parasito.

Figura 10 - Imagem de Microscopia Eletrônica de varredura dos vermes recuperados após o tratamento de 5 dias com As-13.



Fonte: A autora (2018)

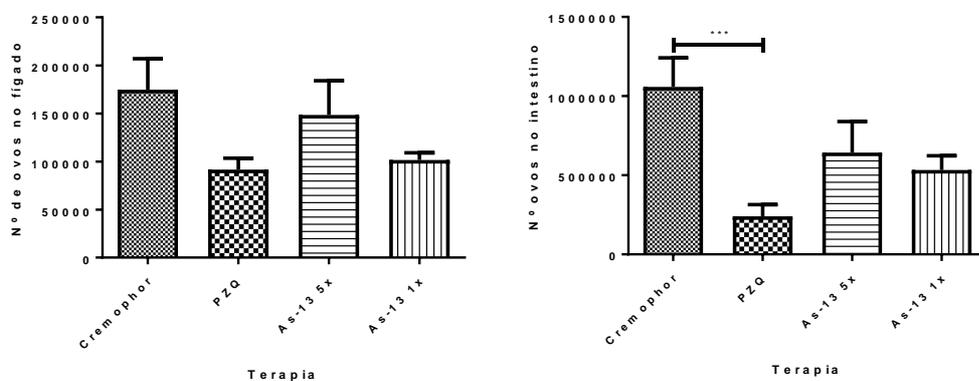
Eletromicrografia de vermes adultos de *S. mansoni* recuperados após tratamento *in vivo* com o composto As-13 por 5 dias consecutivos. A figura A e B são vermes adultos machos em contato com o composto As-13 e a figura C e D são vermes fêmeas em contato com o composto As-13.

4.9 EFEITO DO AS-13 SOBRE A QUANTIDADE DE OVOS NOS ÓRGÃOS

Após o tratamento com As-13 nas duas concentrações, os animais foram submetidos à eutanásia e retirados os órgãos para verificação da quantidade de ovos no fígado e intestino.

Com a técnica quantificação foi possível verificar que houve um decréscimo do quantidade de ovos entre o grupo controle, onde foi administrado o veículo e os tratamentos. No fígado verificou-se a presença de uma média de 17 mil ovos por grama no grupo controle, enquanto que esse número cai nos tratamentos com As-13, como podemos observar no gráfico 4. Para o PZQ, o menor número de ovos detectado, a média ficou em torno de 10 mil, mas essa diferença não foi considerada estatística pelo $p > 0,05$. A diminuição do número de ovos no fígado para as duas terapias com As-13 foram dependentes de dose e frequência. Para os animais administrados 5 dias consecutivos, a média fica em torno de 15 mil ovos, enquanto para a dose única, a média fica em torno de 13 mil ovos por grama de fígado. Essa diferença de número não foi considerada estatisticamente significativa. Para o intestino, houve uma diminuição significativa entre o número de ovos encontrados no grupo tratado com o cremophor e PZQ. Isso indica que o tratamento foi eficaz sobre os vermes e diminui a oviposição. Nos grupos experimentais tratados com As-13 em 5 dias e As-13 em dose única, não houve variação estatística significativa.

Gráfico 4 - Gráfico representando número de ovos no fígado e intestino.

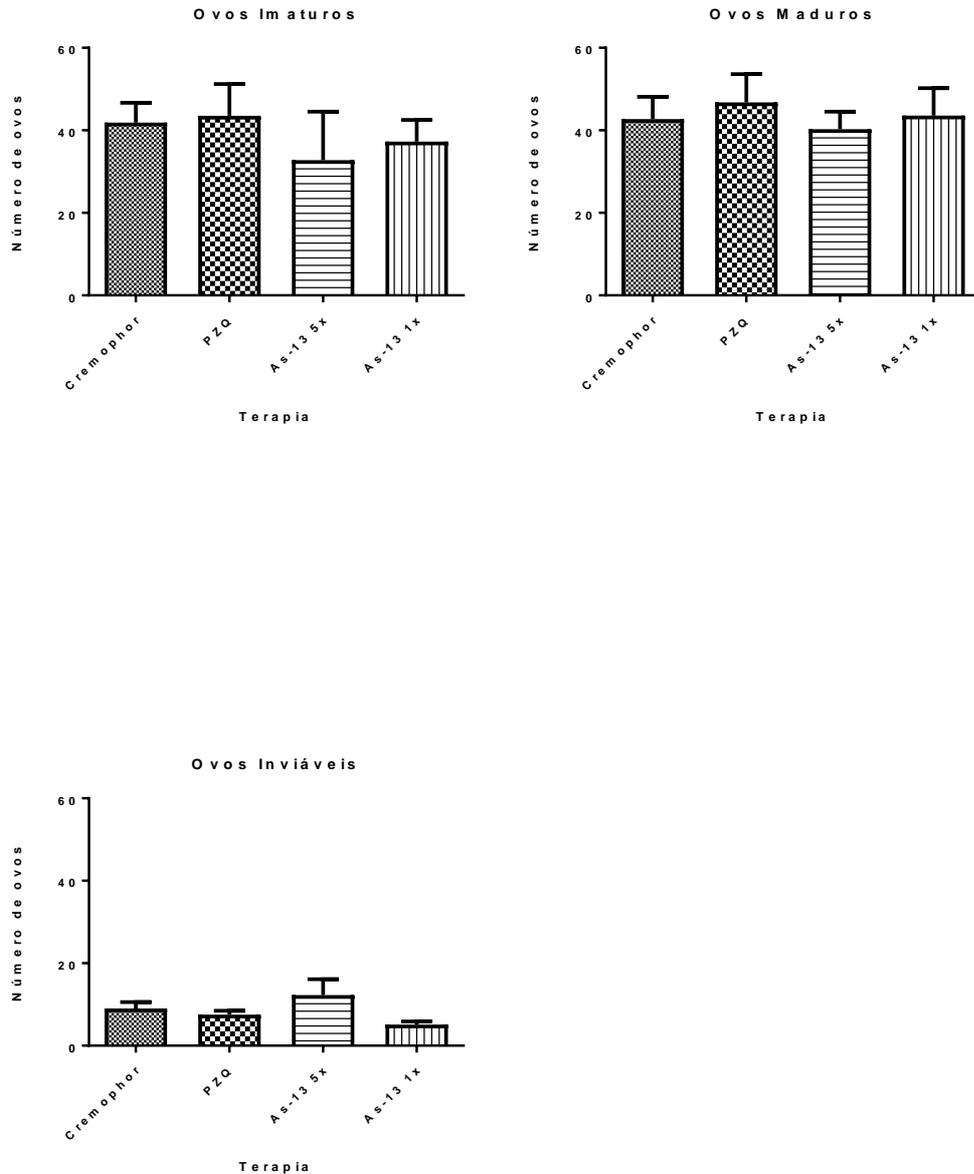


Fonte: Dados da pesquisa (2018)

4.10 EFEITO DO AS-13 SOBRE O ESTADIAMENTO DE OVOS DE *S. MANSONI* NO INTESTINO

A avaliação dos ovos do parasito por meio de seus estágios não demonstrou diferença entre os grupos estudados. Na terapia onde o As-13 foi administrado 5 dias consecutivos, o número de ovos imaturos apresentou uma leve diminuição em sua quantidade, o mesmo aconteceu com o número de ovos maduros e um leve aumento no número de ovos maduros, no entanto, sem significância estatística (Gráfico 5).

Gráfico 5 - Número de ovos divididos por estágios de desenvolvimento e terapia utilizada.



Fonte: Dados da pesquisa (2018)

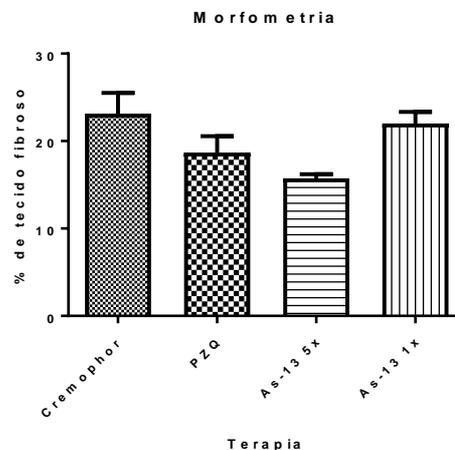
A avaliação da quantidade de ovos distribuídos no tecido intestinal é um critério importante na determinação da atividade esquistossomicida, e permite avaliar os diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *S. mansoni* (KATZ,2008). O oograma é o método de maior fidedignidade que permite, através da análise morfológica, identificar os diferentes estágios de desenvolvimentos dos ovos de *S. mansoni*, que são classificados como viáveis e mortos após a realização dos tratamentos (CUNHA, 1992). Dentre os ovos viáveis, temos os imaturos (1º, 2º, 3º e 4º estágio), e os ovos maduros (5º estágio), o qual é caracterizado pela presença do miracídio totalmente desenvolvido no seu interior (PELLEGRINO; KATZ, 1968).

Não houveram variações estatísticas entre os diversos tratamentos nos três estágios principais dos ovos. No gráfico de ovos imaturos, observou-se uma tendência de diminuição da contagem após o tratamento com As-13 cinco dias consecutivos, mas sem significância estatística. O mesmo quadro aconteceu nos ovos no estágio maduro, mas sem variações estatísticas também. No gráfico pertencente aos ovos inviáveis, podemos notar um aumento no número desses ovos após o tratamento com As-13 cinco dias consecutivos. Esse resultado nos indica que o composto ftalimido-tiazol As-13 pode atuar sobre a maturação dos ovos que estão presentes no fígado.

4.11 MORFOMETRIA

O estudo da atividade de novo composto sobre a reação granulomatosa que se forma ao redor dos ovos do *S. mansoni* é muito importante, uma vez que esta é responsável pela principal patologia da fase crônica grave da esquistossomose, caracterizada pela fibrose que se forma ao redor dos ovos, principalmente, no tecido hepático (LICHTENBERG, 1964). Com base no estudo morfométrico realizado (gráfico 6), o percentual de tecido fibroso diminui levemente na presença de nosso composto na administração de 5 dias consecutivos. É notável a frequência-dependência desse parâmetro, pois quando administrado em dose única, o As-13 apresentou uma média muito semelhante à média do grupo tratado com cremophor. Mesmo diante desses resultados, não houve variação estatística ($p < 0.05$). Uma explicação para esse fato seria a atuação do As-13 preferencialmente em vermes machos e por isso interfere na oviposição. Sendo assim, o composto As-13 não possui ação anti-fibrótica.

Gráfico 6 - Percentual de tecido fibroso por grupo e terapia utilizada

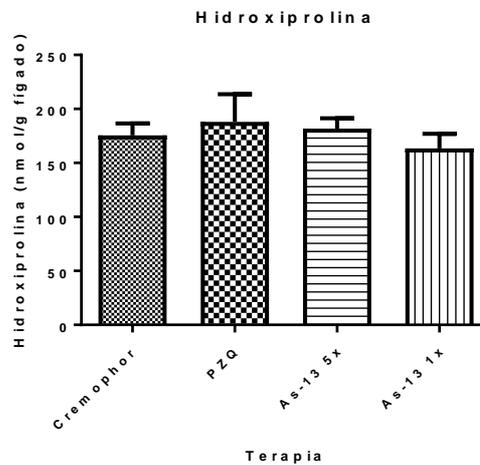


Fonte: Dados da pesquisa (2018)

4.12 HIDROXIPROLINA

Uma característica muito interessante é que a concentração de hidroxiprolina no fígado dos animais infectados, que é uma determinação da deposição de colágeno tecidual. Os nossos testes foram submetidos à análise estatística e não houve variação significativa (**gráfico 7**). Esse experimento nos reafirma o que primariamente nos afirmou a quantificação do tecido fibroso. Não houve variação entre os grupos testados e portanto, não há indícios que o composto As-13 atue na modulação do granuloma de ovos de *S. mansoni* após a doença já estabelecida.

Gráfico 7 - Quantificação de hidroxiprolina no tecido hepático.



Fonte: Dados da pesquisa (2018)

5 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos nesse estudo, podemos concluir que as moléculas da série testada, que são possuidoras do grupo ftalimido-tiazol, são moléculas com atividade esquistossomicida, exceto a As-intermediária e As-01, demonstrando que a presença do grupo fenil substituído são fundamentais para atividade em estudo. Os compostos que apresentaram melhores atividades são as cloro substituídas em *para*, *meta-para* dissubstituído e *orto-para* dissubstituído, As-06, As-12 e As-13, respectivamente. Após o contato do parasito com As-13, os vermes foram recolhidos e processados para microscopia eletrônica de varredura. Os parasitos se apresentaram com bolhas, descamação do tegumento e exposição da musculatura subtegumentar.

Para os três compostos mais promissores da série (As-06, As-12 e As-13), foram realizados os testes *in vitro* para verificar a potencial atividade contra a forma larval do parasito. Nesse ensaio pode-se observar a potente atividade profilática desses compostos, pois mesmo nas menores concentrações testadas todos os compostos alcançaram 100% de mortalidade em até 48 horas em concentrações de 2.5 µg/mL. Sendo assim, um indivíduo que possa estar em diferentes tempos de infecção, poderia alcançar tratamento com um fármaco único que atue em duas fases do *S. mansoni*.

Nos ensaios *in vivo*, as terapias utilizadas demonstraram uma leve queda na quantidade de vermes adultos coletados após o tratamento. O As-13 administrado por cinco dias consecutivos aumentou levemente a presença de ovos mortos ou no inviáveis, mas sem significância estatística, através do método de oograma. As análises de morfometria e hidroxiprolina corroboram com a tendência de queda dos números encontrados no grupo de animais tratados com As-13, no entanto, sem significância estatística. Os resultados apresentados pelo composto As-13 demonstrou-se como um possível fármaco na atividade anti-*S. mansoni* e colaborou na para um possível avanço na terapêutica esquistossomótica.

REFERÊNCIAS

- ABDULLA *et al.* **Schistosomiasis Mansonii: Novel Chemotherapy Using a Cysteine Protease Inhibitor.** *Plos medicine.* 14, 130-138, 2007
- AKGUN, H.; Karamelekoğlu, İ.; Berk, B.; Kurnaz, I.; Sarıbyık, G.; Öktem, S.; Kocagöz, T. **Synthesis and Antimycobacterial Activity of Some Phthalimide Derivatives.** *Bioorg. Med. Chem.* 20 (13), 4149–4154, 2012.
- ALANAZI, AM.; El-Azab, AS.; Al-Suwaidan, IA.; ElTahir, KEH.; Asiri, YA.; Abdel-Aziz, NI; Abdel-Aziz, AAM. 2015. **Structure-Based Design of Phthalimide Derivatives as Potential Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibitors: Anti-Inflammatory and Analgesic Activities.** *Eur. J. Med. Chem.* 92, 115–123.
- ALIANÇA AS dos S, Oliveira AR, Feitosa APS, Ribeiro KRC, de Castro MCAB, Leite ACL, Alves LC, Brayner FA. 2017. ***In vitro* evaluation of cytotoxicity and leishmanicidal activity of phthalimido-thiazole derivatives.** *Eur J Pharm Sci* 105:1–10
- AL-OMARY, F. A. M. *et al.* **Substituted thiazoles V. Synthesis and antitumor activity of novel thiazolo[2,3- b]quinazoline and pyrido[4,3-d]thiazolo[3,2-a]pyrimidine analogues.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, p. 65-72, 2012
- ALMEIDA, M. M. **Efeito da quimioterapia com praziquantel no perfil de citocinas de indivíduos infectados pelo *S. mansoni* portadores de fibrose periportal.** 2009. 78f. (*Mestrado em Ciências Biológicas: Imunopatologia das Doenças Infeciosas e parasitária*) – Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares.
- BAXTER, C. A. R. & RICHARDS H. C. **Schistosomicides. 1. Derivatives of 2aminomethyl-1,2,3,4- tetrahydroquinoline.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 14:1.033-1.042, 1971
- BERGMAN I, Loxley R. 1963. **Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline.** *Anal Chem* 35:1961–1965

BONDOCK, S. *et al.* **Synthesis and antimicrobial evaluation of some new thiazole, thiazolidinone and thiazoline derivatives starting from 1-chloro-3,4-dihydronaphthalene-2-carboxaldehyde.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 42 (7), 948-954, 2007.

BRASIL. **Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) – Coordenadoria do Controle de Doenças. Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose: Normas e Instruções Controle da Esquistossomose do Estado de São Paulo/PCE-SP, versão 2007.)**

BRASIL. **Esquistossomose.** 2018. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose>. Acesso em: 01/06/2018

BRASIL. **Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose.** 2007. Disponível em: ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/doc/manu_esqui.pdf. Acesso em: 20/08/2016

BINA, J. C. & SPINOLA, A. **Convulsão associada ao uso de axamniquine. Relato de um caso.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 10:221-223, 1976

BRINDLEY, P.J. & SHER A. **The Chemoterapeutic effect of praziquantel agains *Schistosoma mansoni* is dependent on host antibody response.** *Journal of Immunology*, 139:215-220, 1987

BROWN, DAVID. **Freshwater Snails of Africa and their Medical Importance** 2. ed. Londres: Taylor E Francis,. 1994.

CAFREY *et al.* **Chemotherapy of Schistosomiasis: present and future.** *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 11, p. 433-439, 2007.

CARVALHO *et al.* ***Schistosoma mansoni* e esquistossomose: uma visão multidisciplinar.** *FIOCRUZ*. Rio de Janeiro; 2008.

CIOLI *et al.* **Antischistosomal drugs: past, presente and future?** *Pharmacology & Therapeutics*, 68: 35-85, 1995

CIOLI, D. **Chemotherapy of schistosomiasis: an update.** *Parasitol Today*, 14, 418-422, 1998.

COUSIN *et al.* **Schistosoma mansoni: transformation of cercarie to schistosomules in ELAC, saline and phosphate-buffered saline.** *The journal of Parasitology*, 72:609-611, 1986

CUNHA, A. S. **Avaliação terapêutica da oxamniquine na esquistossomose mansoni humana pelo método do oograma por biópsia de mucosa retal.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, Vol. 24, pp. 88 -94,1982.

DATASUS. **Sinan: casos de Pernambuco.** 2018. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinan/pce/cnv/pcepe.def>. Acesso em: 08/06/2018

DAVIS, G.M. **Different modes of evolution and adaptive radiation in the Pomatiopsidae.** *Malacologia*. 21,209-262, 1982

DEELDER, A. M. et al. **Detection os schistosome antigen in Mummies.** *Lancet*, 335:724-725, 1990

DA SANTANA, TI, BARBOSA, MO, GOMES, PATM, DA CRUZ, ACN, DA SILVA, TG, LEITE, ACL . **Synthesis, anticancer activity and mechanism of action of new thiazole derivatives.** *European journal of medicinal chemistry*, v. 144, p. 874-885, 2017.

DE MORAES GOMES, PAT, PENA, LJ, LEITE, ACL . **Isatin derivatives and their antiviral properties against arboviruses, a Review.** *Mini-reviews in medicinal chemistry*, v. 18, p. 05-25, 2018.

DE SOUZA, C.P. e LIMA, L.C. **Moluscos de Interesse Parasitológico do Brasil.** *Belo Horizonte, Brazil. Serie de esquistossomose n. 1. FIOCRUZ/CPqRR*, 1997

DOENHOFF, M. J. *et al.* **Evidence for an imune-dependent action of praziquantel on Schistosoma mansoni in mice.** *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygyene*, 81:947-951, 1987

DOMINGUES, A.L. & COUTINHO, A. **Tratamento a esquistossomose mansônica com**

oxamniquine oral. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 17:164-180,1975
 DOS SANTOS SILVA, TD, BOMFIM, LM, DA CRUZ RODRIGUES, ANA CAROLIAMC,
 DIAS, RB, SALES, CBS ; ROCHA, CLARISSA AG, SOARES,MB, BEZERRA, DP; DE
 OLIVEIRA CARDOSO, MV, LEITE, ACL, MILITÃO, GCG. **Anti-liver cancer activity in
 vitro and in vivo induced by 2-pyridyl 2,3-thiazole derivatives.** *Toxicology and applied
 pharmacology*, v. 329, p. 212-223, 2017.

F. CHIMENTI, *et al.* **Selective inhibitory activity against MAO and molecular modeling
 studies of 2-thiazolyldrazone derivatives.** *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 707-712,
 2007

F. CHIMENTI *et al.* **Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-disubstituted-1,3-
 thiazoles as anti-Candida spp.** *Agents European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 378-
 382, 2011.

FALLON, P.G. *et al.* **Short report: diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal
 isolate of *Schistosoma mansoni*.** *Am J Trop Med Hyg* 53, 61–62, 1995.

FENWICK, A., *et al* **Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug
 resistance.** *Current Opinion in Infectious Diseases*, 19, 577-582, 2006.

FIOCRUZ. **Praziquantel**, 2016. Disponível em: <http://www.far.fiocruz.br/farmanguinhos/images/stories/phocadownload/praziquantel.pdf>. Acesso em: 19/08/2016

FOSTER, R. *et al.* **Studies with the schistosomicide oxamniquine (UK-4271). II. Activity in
 primates.** *Transactions of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene*, 67:685-
 693,1973

FOSTER, R. *et al.* **The preclinical development of oxaminiquine.** *Revista do instituto de
 medicinal tropical de São Paulo*, 15:1-9, 1973

G. TURAN-ZITOUNI *et al.* **Synthesis and antituberculosis activity of new
 thiazolyldrazone derivatives.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 981-985,
 2008.

GAZZINELLI *et al.* **Immune responses during human Schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active case of schistosomiasis.** *Journal of Immunology*, 130:2.891-2.895, 1983

GREENBERG, R. M. **Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action?** *International Journal for Parasitology* 35, 1-9, 2005.

GOMES, P.A.T. M. *et al.* **New 1,3-thiazole derivatives and their biological and ultrastructural effects on *Trypanosoma cruzi*.** *American Journal of Medicinal Chemistry*.2016

GUISSE, F. *et al.* **Therapeutic evaluation of two different dose regimens of praziquantel in a recent *Schistosoma mansoni* focus in Northern Senegal.** *Am J Trop Med Hyg* 56, 511–514, 1997.

HERNANDES MZ, RABELLO MM, LEITE ACL, CARDOSO MVO, MOREIRA DRM, BRONDANI DJ, SIMONE CA, REIS LC, SOUZA MA, PEREIRA VRA. **Studies toward the structural optimization of novel thiazolyldihydrazone-based potent antitrypanosomal agents.** *Bioorg Med Chem* 18:7826–7835, 2010

HOFFMAN W.A., PONS J.A., JANER S.L. **The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*.** *Puerto Rico Journal of Public Health*, 9, 283-291, 1934.

HOLLA *et al.* **Synthesis of some new 2,4-disubstituted thiazoles as possible antibacterial and anti-inflammatory agents.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38(3), 313-318, 2003.

HOLTFRETER, *et al.* ***Schistosoma mansoni*: Schistosomicidal effect of mefloquine and primaquine *in vitro*.** *Experimental Parasitology*, v. 127, p. 270-276, 2011.

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.

JEZIORSK M.C., *et al* **Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: Potential role in praziquantel action.** *Int. Journal of Parasitology*, 36 (6), 625-632, 2006.

JIRAUNGKOORSKUL, W. *et. al.* **Effects of praziquantel and artesunate on the tegument of adult *Schistosoma mekongi* harboured in mice.** *Parasitol Int* .54,177– 183, 2005.

KATZ *et al.* **Clinical trials with oxamniquine, by oral route, in antischistosomiasis mansoni.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 18:371-377, 1976

KATZ *et al.* **Field trials with oxamniquine in schistosomiasis mansoni endemic áreas.** *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*,. 26:234-237, 1977

KATZ, N. **Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni, In: *Schistosoma mansoni* & esquistossomose: uma visão multidisciplinar**, CARVALHO, O. S., COELHO, P. M. Z. & LENZI, H. L. (eds), 825-870, Fiocruz, Rio de Janeiro, Brasil, 2008.

KATZ, N. **Resultados atuais na terapêutica clínica da esquistossomose mansônica.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 22, supl.4:123-133, 1980

KAYE, B. & WOOLHOUSE, W. M. **The metabolism of a new schistosomicide 2-isopropylaminomethyl-6-methyl-7-nitro-1,2,3,4,-tetrahydroquinoline (UK3883).** *Xenobiotica*, 2:169-178,1972

LAMBERTUCCI JR. **Acute schistosomiasis: revisited and reconsidered.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. V. 105, n. 4, p. 422-435, 2010.

LAMIE PF.; Philoppes, JN.; El-Gendy, AO.; Rarova, L.; Gruz, J. **Design, Synthesis and Evaluation of Novel Phthalimide Derivatives as in Vitro Anti-Microbial.** *Anti-Oxidant and Anti-Inflammatory Agents*. *Molecules* 2015, 20 (9), 16620–16642

LEITE BHS, Rodrigues GGP, Fernandes VV, Medeiros CS, Correira AA, de Sousa IFAC. **Incidência de esquistossomose mansônica em Pernambuco no Período compreendido entre 2010 a 2016.** Cadernos da graduação: ciências biológicas e da saúde. V.3, n. 2, p. 57-66, 2017.

LETÍCIA, M.; Barbosa, D. C.; José, T.; Ramos, F.; Carolina, A.; Arantes, S. De; Martins, M. A.; Machado, P.; Barreiro, E. J.; Lima, L. M. **Synthesis and Pharmacological Evaluation of Novel Phenyl Sulfonamide Derivatives Designed as Modulators of Pulmonary Inflammatory Response.** *Molecules*. 2012, 1454, 14651–14672.

LICHTENBERG, F. V. Studies on granuloma formation III Antigen sequestration and destruction in the Schistosome pseudo tubercle. *The American Journal of Pathology*, V.45, p.75- 93, 1964

LIPINSKI CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. **Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings.** *Advanced drug delivery*. V. 23, p. 3-25, 1996

LO NC, Addiss DG, Hotez PJ, King CH, Stothard JR, Evans DS, Colley DG, Lin W, Coulibaly J9, Bustinduy AL, Raso G, Bendavid E, Bogoch II, Fenwick A, Savioli L, Molyneux D, Utzinger J, Andrews JR. **A call to strengthen the global strategy against schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: the time is now.** *Lancet Infect Dis*. 2017 Feb;17(2), 2017

MACHADO, A.J. *et al.* ***Schistosoma mansoni*: The role of the complement C3-activating system in the cercaricidal action of normal serum.** *Experimental Parasitology*, 38:20-29,1975

MICHEL, P.; Ferreira, P.; Marçal, P.; Costa, D. A.; Costa, A. D. E. M.; Jereissati, D.; Lima, B. **Cytotoxic and Toxicological Effects of Phthalimide Derivatives on Tumor and Normal Murine Cells.** *An. Acad. Bras. Ciênc.* 2015, 87, 313–330.

MORAES, J. *et al.* ***Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine.** *Experimental. Parasitol.* 127:357–364. 2011

MORGAN *et al.* ***Schistosoma mansoni* and Biomphalaria: past history and future trends.** *Parasitology*, 123, pp 211-228, 2003

NEVES, J.K.A.L *et al.* **Antichistosomal action action of thioxo-imidazolidine compounds: An ultrastructural and cytotoxicity study.** *Experimental Parasitology*, 128, 82-90, 2011.

PELLEGRINO, J. & KATZ, N. - **Experimental chemotherapy of Schistosomiasis mansoni,** *Advances in Parasitology*, Vol. 6, pp. 233-290, 1968.

PELLEGRINO *et al.* **Experimental chemotherapy os schistosomiasis. VI- Laboratory trials with oxamniquine, a new antischistosomal agent.** *Revista do Instituto de medicina Tropical de São Paulo*, 15,supl. 1:10-14, 1973

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, 2004

RAMALHO-PINTO, F.J. ***Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomula *in vitro*.** *Exp Parasitol* 36: 360-372, 1974.

RAMIREZ, *et al.* **Schistosomes: challenges in compound screening.** *Expert Opin. Drug Discov.*, v. 2, p. S53-S61, 2007.

REZENDE, G. L. **Survey on the clinical trial results achieved in Brazil coparing praziquantel and oxamniquine in the treatment of mansoni schistosomiais.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 27:328-336, 1985

RICHARDS, H.C. & FOSTER, R. **A new series of 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivatives displaying schistosomicidal activity in rodents and primates,** *Nature*. 222:581-582, 1969

ROCHA *et al.* **Aspectos epidemiológicos e distribuição dos casos de infecção pelo *Schistosoma mansoni* em municípios do Estado de Alagoas, Brasil.** *Rev Pan-Amaz Saude*. 7(2):27-32, 2016

SABAH A. A. *et al.* ***Schistosoma mansoni*: reduced efficacy of chemotherapy in infected T-cell-deprived mice.** *Experimental Parasitology*, 60:348-354, 1985

Sabah, A.A, Fletcher, C, Webbe, G, Doenhoff, M.J. ***Schistosoma mansoni*: Chemotherapy of infections of different ages.** *Experimental Parasitology*, 61, Issue 3,1986

SALAFSKY, B, FUSCOK, A.C, NOWICKI, WHITLEYD., ELLENBERGER, B. ***Schistosoma mansoni*: Analysis of cercarial transformation methods.** *Experimental Parasitology* . Volume 67, Issue 1, 1988.

SAMOIL, V, DAGENAIS, M, GANAPATHY, V, ALDRIDGE, J, GLEBOV, A, JARDIM, A, RIBEIRO, P. **Vesicle-based secretion in schistosomes: Analysis of protein and microRNA (miRNA) content of exosome-like vesicles derived from *Schistosoma mansoni*.** *Scientific Reports* vol 8, 2018

SANTIAGO E.F. *et al.* **Evaluation of the anti-*Schistosoma mansoni* activity of thiosemicarbazones and thiazoles.** *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):352-63.

SAYED, *et al.* **Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis.** *Nature*, 14, 407-412, 2008.

SILVA *et al.* **Clinical trials with oral oxamniquine (UK4271) for the treatment of mansoni schistosomiasis.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 16:103-109, 1974

SINGH, A. K.; Rajendran, V.; Pant, A.; Ghosh, P. C.; Singh, N.; Latha, N.; Garg, S.; Pandey, K. C.; Singh, B. K.; Rathi, B. **Design , Synthesis and Biological Evaluation of Functionalized Phthalimides : A New Class of Antimalarials and Inhibitors of Falcipain-2, a Major Hemoglobinase of Malaria Parasite.** *Bioorg. Med. Chem.* 2015, 23 (8), 1817–1827.

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

STELMA, F.F. *et al.* **Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*.** *Am J Trop Med Hyg* 53, 167–170, 1995

STIREWALT, M. A. ***Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule.** *Advances in parasitology*, 12:115-182, 1974

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

TURAN-ZITOUNI, A. *et al.* **Synthesis and antituberculosis activity of new thiazolylhydrazone derivatives.** *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 981-985, 2008

UTZINGER, J. *et al.* **Current progress in the development and use of artemether for chemoprophylaxis of major human schistosome parasites.** *Curr Med Chem* , 8, 1841-1859, 2001.

VERISSIMO, M; Cardoso, DO.; Rodrigo, D; Bezerra, G; Filho, O; Melo, S; Cavalcanti, T; Pontes, W; Rubio, L; Cunha, L. 2015 **European Journal of Medicinal Chemistry Design , Synthesis and Structure e Activity Relationship of Phthalimides Endowed with Dual Antiproliferative and Immunomodulatory Activities.** *Eur. J. Med. Chem.* 96, 491–503.

VITORINO *et al.* **Esquistossomose mansônica: diagnóstico, tratamento, epidemiologia, profilaxia e controle.** *Rev Soc Bras Clin Med.* 10(1):39-45, 2012

WEBBE, G. & JAMES, C. **A comparison of the susceptibility to praziquantel of *Schistosoma haematobium*, *S. japonicum*, *S. mansoni*, *S. intercalatum* and *S. mattheei* in hamsters.** *Zeitschrift fur Parasitenkunde*, 52:169-177, 1977

WHO. **Schistosomiasis: strategy.** 2018. Disponível em: <http://www.who.int/schistosomiasis/disease/en/> . Acessado em 08/06/2018

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA



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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Recife, 12 de abril de 2016

Carta – Resposta

Projeto nº 79/2015

Ao pesquisador (a): Dr^a Sheilla Andrade de Oliveira

Informo que o projeto “NOVOS CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTI-SCHISTOSOMA MANSONI: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA E DOS ESTUDOS DO MECANISMO DE AÇÃO DE MOLÉCULAS ANTI-PARASITÁRIAS” proposto por V.S. foi aprovado pela CEUA/CPqAM em 12/04/2016, seguindo, anexo o respectivo Certificado de Aprovação pela Secretaria da CEUA/CPqAM.

Cordialmente

 Dra Maria Edileuza F. Brito
 Vice-Coordenador(a) CEUA/CPqAM (em exercício)

Maria Edileuza F. de Brito
 Pesquisadora em Saúde Pública
 Mat. SIAPE 464741 / Dpto de Imunologia
 Chefe do LIMP - CPqAM / FIOCRUZ