



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
INSTITUTO KEIZO ASAMI  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE - PPGBAS

RUBENS EMANOEL TAVARES DA ROCHA

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA *in vitro* e ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *in vivo* DE  
DERIVADOS N-FENIL-2-BENZILIDENO-HIDRAZINACARBOTIAMIDA FRENTE AO  
*Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907)**

RECIFE

2022

RUBENS EMANOEL TAVARES DA ROCHA

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA *in vitro* e ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *in vivo* DE  
DERIVADOS N-FENIL-2-BENZILIDENO-HIDRAZINACARBOTIAMIDA FRENTE AO  
*Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907)**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Instituto Keizo Asami – iLIKA/UFPE, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biologia Aplicada à Saúde.

Área de Concentração: Biologia Aplicada à Saúde

**Orientador:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Luiz Carlos Alves

**Coorientadores:** Prof<sup>o</sup>. Dr. Fábio André Brayner

Dra. Maria Eliane Bezerra de Mélo

RECIFE

2022

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Rocha, Rubens Emanuel Tavares da.

Avaliação citotóxica *in vitro* e atividade esquistossomicida *in vivo* de derivados n-fenil-2-benzilideno-hidrazinacarbotiamida frente ao *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). / Rubens Emanuel Tavares da Rocha. – 2022.

68 f. : il., fig.; tab.

Orientador: Luiz Carlos Alves.

Coorientador: Fábio André Brayner.

Coorientadora: Maria Eliane Bezerra de Melo.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia aplicada à saúde, 2022.

Inclui referências.

1. *Schistosoma mansoni*. 2. Testes biológicos. 3. Tiazóis. 4. Tiossemicarbazonas. 5. Tiazolidinonas. I. Alves, Luiz Carlos. (Orient.). II. Brayner, Fábio André. III. Melo, Maria Eliane Bezerra de. IV. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-116

**AVALIAÇÃO CITOTÓXICA *in vitro* e ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *in vivo* DE  
DERIVADOS N-FENIL-2-BENZILIDENO-HIDRAZINACARBOTIAMIDA FRENTE AO**

*Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907)

Aprovada em: 27/07/2022

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves (Orientador)  
Instituto Keizo Asami – iLIKA/UFPE

---

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

---

Prof. Dra. Marília Gabriela dos Santos Cavalcanti (Examinadora Externa)  
Universidade Federal da Paraíba - UFPB

---

Prof. Dr. Wheverton Ricardo Correia do Nascimento (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

---

Prof. Dr. Thiago José Matos Rocha (Examinador Externo)  
Universidade Estadual de Ciências da Saúde de Alagoas - UNCISAL

Dedico este trabalho aos meus pais, Rosimar Tavares de Mendonça e Marcos Eraldo da Rocha, por acreditarem no meu potencial e jamais me deixar desistir.

Este trabalho é por vocês e para vocês!

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem Ele nada seria possível.

A minha Família, em especial aos meus pais Rosimar Tavares e Marcos Rocha, minhas irmãs Emmanuelle Tavares e Eveline Rocha, por todo o suporte, amor, confiança e carinho.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Carlos Alves e meu coorientador, Dr. Fábio Brayner, pelos conselhos, pelas oportunidades, pela orientação no trabalho e na vida e acima de tudo pela confiança em mim depositada.

A minha coorientadora e chefinha, Dra. Eliane Mélo, por acreditar em mim 10 anos atrás, me concedendo uma bolsa de Iniciação Científica, acreditando no meu potencial e por todo carinho e amor por mim ao longo desta jornada acadêmica.

Aos meus companheiros do Laboratório de Biologia Celular e Molecular e Laboratório de Leishmaniose e Mutagênese, em especial aos meus amigos Amanda Vasconcelos, Jana Sandes, Rafael Padilha, Gabriel Gazzoni, Alberon Araújo e Dyana Leal, obrigado por todos os ensinamentos, todos os cafés, as reuniões extra-Ageu e a vivência ao longo da Pós-Graduação.

Aos meus amigos Anderson Silva e Fernanda Dias pela parceria e ajuda neste trabalho, vocês foram incríveis.

Aos meus amigos Antônio Sérgio e Nairomberg Portela, o meu #TeamSchisto, por toda a ajuda e suporte na elaboração e execução deste trabalho.

Aos meus amigos do iLIKA, em especial a Maria Helena Menezes, Ananda Maria, Thaysa Aragão, Gabriela Calixto e Carol Wanderley, sem vocês esta jornada seria ainda mais difícil.

Ao Laboratório de Química e Inovação Terapêutica, na pessoa da Dra. Maria do Carmo, pelo suporte e concessão das moléculas para a execução deste trabalho.

Ao meu aluno de Iniciação Científica, Lucas Melo, por viver e participar ativamente na execução deste trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, em especial ao amigo Fábio Costa, pela paciência e acima de tudo, a sua inegável prestatividade, sempre ajudando a resolver os problemas (que não foram poucos) ao longo de 6 anos de PPGBAS.

Ao Instituto Ageu Magalhães e o Instituto Keizo Asami por permitirem a execução deste trabalho.

A equipe do Biotério de Criação do IAM, em especial a Jorge Ricardo e Ângela Vieira por toda a ajuda nos momentos mais complicados.

A Dra. Maria Helena e toda a equipe do Biotério do iLIKA, por sempre estarem ao nosso lado.

A querida Cristiane Brito, secretária do Departamento de Parasitologia do IAM por todo o suporte nestes 10 anos de jornada.

A banca examinadora pela disponibilidade e todas as contribuições feitas ao trabalho.

A CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado.

Aos meus alunos, que ao longo destes anos, moldaram o profissional que sou e fazem com que eu cresça um pouco mais a cada dia.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para que este momento fosse possível.

Muito obrigado!

“Onde houver tristeza, que eu leve a alegria”

Oração de São Francisco de Assis

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença negligenciada que afeta regiões tropicais e subtropicais. Estima-se que 240 milhões de pessoas são portadoras e que 500 mil indivíduos morrem por ano. O tratamento é realizado desde a década de 70 preferencialmente com o praziquantel, medicamento de baixo custo e alta taxa de êxito. Contudo cepas começam a se mostrar refratárias e existem efeitos adversos. Compostos derivados de tiazóis, como tiossemicarbazonas e tiazolidinona já se apresentam como alternativa pelo *hall* de atividades biológicas demonstradas. Nesta perspectiva, o presente trabalho objetivou testes *in vitro* e *in vivo* dos compostos JF31, JF43 e NJ22 da série N-FENIL-2-BENZILIDENO-HIDRAZINACARBOTIAMIDA frente ao *Schistosoma mansoni*. Foram realizados testes de citotoxicidade, quantificação de óxido nítrico, avaliação do potencial hemolítico e genotóxico, determinação da toxicidade aguda, eficácia do tratamento em camundongos esquistossomóticos, avaliação do perfil dos granulomas e ultraestrutura dos vermes recuperados. No que tange a citotoxicidade, o composto JF31 apresentou CC<sub>50</sub> de 219,82µM, JF43 - 57,41µM e NJ22 - 70,35 µM. Todos os compostos demonstraram produção de NO, com destaque ao JF31 que obteve índices próximos ao PZQ. Nenhum grupo experimental apresentou potencial genotóxico e todos foram seguros nos testes de toxicidade aguda. O composto JF31 obteve o menor índice de potencial hemolítico, com 0,22%. O composto NJ22 apresentou uma eficácia de 67,86%, e o composto JF31, 48,21%. Analisando a quantidade de ovos, o composto JF31 e o PZQ não apresentam diferença estatística, assim como na quantidade de ovos inviáveis no intestino. A menor área de granulomas foi a do composto NJ22 (87.772,371µm<sup>2</sup>), seguidos dos compostos JF31 e JF43. Sobre a quantificação de colágeno, o melhor composto foi o JF31, com uma média de 11%. Os vermes obtidos pós-tratamento apresentaram alterações ultraestruturais, como perda de tubérculos e alterações do tegumento. Através de uma análise de componentes principais, verificou-se uma similaridade de 79,69% do composto JF31 com o PZQ. Diante disso, compostos da série se mostraram promissores como possíveis fármacos com atividade esquistossomicida.

**Palavras-chave:** *Schistosoma mansoni*; Testes biológicos; Tiazóis; Tiossemicarbazonas; Tiazolidinonas.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected disease that affects tropical and subtropical regions. It is estimated that 240 million people are carriers and that 500,000 individuals die each year. The treatment has been carried out since the 1970s, preferably with praziquantel, a low-cost drug with a high success rate. However, strains are beginning to be refractory and there are adverse effects. Compounds derived from thiazoles, such as thiosemicarbazones and thiazolidinone, are already presented as an alternative due to the hall of demonstrated biological activities. In this perspective, the present work aimed at in vitro and in vivo tests of the compounds JF31, JF43 and NJ22 of the N-PHENYL-2-BENZYLIDENE-HYDRAZINECARBOTHIAMIDE series against *Schistosoma mansoni*. Cytotoxicity tests, quantification of nitric oxide, evaluation of hemolytic and genotoxic potential, determination of acute toxicity, efficacy of treatment in schistosomal mice, evaluation of the profile of granulomas and ultrastructure of recovered worms were carried out. Regarding cytotoxicity, compound JF31 showed a CC50 of 219.82 $\mu$ M, JF43 - 57.41 $\mu$ M and NJ22 - 70.35 $\mu$ M. All compounds showed NO production, with emphasis on JF31, which obtained rates close to PZQ. No experimental group showed genotoxic potential, and all were safe in acute toxicity tests. The compound JF31 obtained the lowest index of hemolytic potential, with 0.22%. Compound NJ22 showed an efficacy of 67.86%, and compound JF31, 48.21%. Analyzing the number of eggs, the compound JF31 and PZQ did not show statistical difference, as well as the number of non-viable eggs in the intestine. The smallest area of granulomas was that of compound NJ22 (87,772.371 $\mu$ m<sup>2</sup>), followed by compounds JF31 and JF43. Regarding collagen quantification, the best compound was JF31, with an average of 11%. The worms obtained after treatment showed ultrastructural alterations, such as loss of tubercles and tegument alterations. Through an analysis of principal components, a similarity of 79.69% of the compound JF31 with PZQ was verified. In view of this, compounds from the series have shown promise as possible drugs with schistosomicidal activity.

**Keywords:** *Schistosoma mansoni*; Biological tests; thiazoles; Thiosemicarbazones; Thiazolidinones.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 1 – Ciclo da Esquistossomose .....	19
Fig. 2 – Fórmula estrutural do Praziquantel .....	22
Fig. 3 – Gráficos de nitrito de sódio para quantificação de óxido nítrico .....	37
Fig. 4 – Número de eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE) com micronúcleos.....	38
Fig. 5 – Gráfico de incremento de peso no teste de Toxicidade Aguda.....	40
Fig. 6 – Contagem de ovos pela técnica de Cheever .....	42
Fig. 7 – Classificação dos ovos pela técnica do Oograma .....	44
Fig. 8 – Perfil dos granulomas hepáticos dos grupos teste e controles .....	46
Fig. 9 – Análise de deposição de colágeno .....	47
Fig. 10 – Perfil de deposição de colágeno nos granulomas hepáticos dos grupos teste e controles.....	48
Fig. 11 – Alterações ultraestruturais visualizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura .....	50
Fig. 12 – Análise de Componentes Principais – PCA dos grupos teste e controles.....	52

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Citotoxicidade em Eritrócitos e Células de Macrófagos J774A.1 .....	36
Tabela 2 – Parâmetros e Tempos de Análise para detecção de Toxicidade Aguda.....	39
Tabela 3 – Medidas de Peso Pré e Pós-Tratamento para Detecção de Toxicidade Aguda .....	39
Tabela 4 – Contagem de ovos nos fígados e intestinos e correlação com as médias de peso dos órgãos .....	42

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
1.1 OBJETIVOS.....	16
<b>1.1.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1.2 Objetivos Específicos .....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>18</b>
2.1 A ESQUISTOSSOMOSE.....	18
2.2 CICLO DE TRANSMISSÃO.....	19
2.3 A ULTRAESTRUTURA DO <i>S. mansoni</i> .....	20
2.4 A IMUNOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE.....	21
2.5 TRATAMENTO.....	22
<b>2.5.1 O Praziquantel e a Oxaminiquine (OXA).....</b>	<b>22</b>
<b>2.5.2 As problemáticas do PZQ .....</b>	<b>23</b>
2.6 ATIVIDADE BIOLÓGICAS DE NOVOS COMPOSTOS .....	24
<b>2.6.1 Tiazóis, tiossemicarbazonas e tiazolidinonas.....</b>	<b>24</b>
<b>2.6.2 Derivados tiazolidínicos da série N-fenil-2-benzilideno-hidrazinacarbotiamida .....</b>	<b>26</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>27</b>
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS .....	27
3.2 MOLÉCULAS UTILIZADAS NO ESTUDO.....	27
3.3 VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO EM MACRÓFAGOS J774A.1 .....	28
3.4 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) NO SOBRENADANTE DE CULTURAS MACROFÁGICAS J774A.1 .....	28
3.5 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO .....	29
3.6 POTENCIAL HEMOLÍTICO .....	29
3.7 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA .....	30
3.8 TESTE DA SUSCETIBILIDADE <i>in vivo</i> DE VERMES ADULTOS DE <i>S. mansoni</i> FRENTE AOS DERIVADOS N-FENIL-2-BENZILIDENO-HIDRAZINACARBOTIAMIDA.....	31
3.9 TÉCNICA DO OOGRAMA .....	31
3.10 CONTAGEM DOS OVOS NO FÍGADO E INTESTINO.....	32

3.11 DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO .....	32
3.12 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DOS GRANULOMAS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM <i>S. mansoni</i> .....	32
3.13 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL.....	33
3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	33
<b>4 RESULTADOS .....</b>	<b>35</b>
<b>5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>59</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>60</b>
ANEXOS .....	68
<b>ANEXO 1 – Comitê de Ética em Uso de Animais.....</b>	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença infecciosa que está incluída na lista de Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS), onde mais de 240 milhões de pessoas encontram-se infectadas, 700 milhões de pessoas estão em eminente risco de infecção, levando a óbitos aproximadamente 500.000 anualmente indivíduos (WHO, 2020). No Brasil, a esquistossomose é um problema de saúde pública que afetou cerca de 1,5 milhões de pessoas em 2017 (BRITO et al., 2020). A esquistossomose mansoni é causada pelo verme trematódeo, da família Schistosomatidae, gênero *Schistosoma* da espécie *Schistosoma mansoni*. Para a manutenção do ciclo de vida do parasito, necessita-se do hospedeiro intermediário, o caramujo, pertencente ao gênero *Biomphalaria* (BRASIL, 2020).

Para o controle da esquistossomose a quimioterapia vem sendo a ação mais efetiva para impedir a evolução da doença (KATZ, 2018). Desde a década de 70 o medicamento utilizado na clínica para o tratamento da esquistossomose mansoni tem sido o praziquantel (PZQ) (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino{2,1-a}isoquinolina-4-ona), o qual se destaca pela sua eficácia contra todas as espécies do gênero *Schistosoma* e o baixo custo, apesar de apresentar várias reações adversas, tais como náuseas, vômitos, desconforto abdominal, anorexia e diarreia (VALE et al., 2017).

Além disso, também são relatados episódios de cefaleias, tonturas, sonolência e em alguns casos, erupções cutâneas e urticárias, associadas a um quadro de febre e fadiga (SILVA et al., 2017). Associados aos sintomas mais frequentes, a bula do medicamento disponibilizado pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), indica que o mesmo não deve ser utilizado em pessoas com cisticercose ocular, portadores de insuficiências hepáticas ou renais, além de gestantes e lactantes, pois o mesmo pode ser excretado via leite materno nos 3 meses subsequentes à administração.

Com o uso exclusivo do PZQ, foram relatadas evidências de casos que indicaram possíveis resistências de cepas de *Schistosoma*. Diante das limitações do tratamento da esquistossomose, citadas anteriormente, existe a necessidade da pesquisa de novos agentes esquistossomicidas que possam ser utilizados como alternativa para o tratamento desta parasitose (VALE et al., 2017).

Baseado na necessidade de novas medidas terapêuticas, a química medicinal surgiu com mais força no Brasil a partir da década de 90, como possibilidade para obtenção de novos quimioterápicos, mais especificamente em 1993 através do Marco Para os Químicos Medicinais Brasileiros. A partir daí, as principais doenças alvo dos estudos da química medicinal até o ano de 2017 foram: câncer, Doença de Chagas, Inflamação/dor e infecções bacterianas e fúngicas, representando assim, 67% das publicações relacionadas a estes temas (AMARAL et al., 2017), sugerindo assim, a necessidade de maiores estudos em outras doenças infecto parasitárias.

Vários fatores podem influenciar ou direcionar o estudo de novos compostos candidatos à fármacos, como por exemplo, a resistência dos parasitos aos medicamentos preconizados (NWEZE et al., 2021). Todo processo de desenvolvimento de novas substâncias candidatas a fármacos é complexo, apresenta alto custo estando atrelada a cooperação entre várias áreas estratégicas em ciência e tecnologia. (AMARAL et al., 2017).

Segundo Álvarez-Bardón et al. (2020), a utilização de produtos sintéticos na busca de elucidações e de novas perspectivas farmacológicas é menor do que a tentativa de descobertas através de compostos naturais. Diante disto, os compostos derivados de tiazol, como as tiossemicarbazonas e as tiazolidinona, demonstram uma ampla atividade farmacológica por apresentarem um núcleo preservado e permitir a capacidade de inserções e modificações nos radicais, aumentando assim, o seu espectro de atividade biológica (ABEED et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2019).

16 compostos foram sintetizados no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica (LqIT) do Departamento de Antibióticos da UFPE, recebendo esta série o nome de N-FENIL-2-BENZILIDENO-HIDRAZINACARBOTIAMIDA. Todos os compostos têm como base o grupo tiazol, sendo divididos em 5 tiossemicarbazonas, 5 tiazolidinonas e 6 derivados tiazolidínicos. Com estes grupos químicos, já foram registrados estudos com atividade antitumoral (SUBHASHREE et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2017; HUSSEIN et al., 2015), antivirais e antibacterianos (HUSSEIN et al., 2015), anti-tripanosomatídea (ESPÍNDOLA et al., 2015), antidibética (TSUYOSHI et al., 2002), anti-inflamatória (BARROS et al., 2010), anti-oxidante (SWATHI et al., 2012), anti-tubercular (PATTAN et al., 2008).

Frente a todas estas atividades biológicas, poucos estudos têm avaliado a ação frente ao *Schistosoma mansoni*. Almeida-Júnior et al., (2019) que avaliaram *in vitro* a ação de derivados indólicos e tiossemicarbazonas frente a vermes jovens e adultos e estudo de Pereira et al., (2019) avaliaram a ação de derivados de tiazol *in vitro* contra esquistossômulos e vermes adultos; a prospecção de tiossemicarbazonas com atividade esquistossomicida *in vitro*, realizado por Da Silva et al., (2018) e estudos prévios realizados por Rocha et al., (2022).

Sendo a esquistossomose uma doença de alta incidência e prevalência no Brasil e em especial no Estado de Pernambuco; diante da necessidade de buscar novas perspectivas com atividade esquistossomicida *in vivo*, e os escassos estudos na área, a descoberta de novos compostos sintéticos apresenta grande relevância no âmbito da saúde pública, o presente estudo tem como objetivo avaliar *in vitro* e *in vivo* a eficácia da série N-fenil-2-benzilideno-hidrazinacarbotiamida frente a fase adulta do *Schistosoma mansoni*, visando a identificação de possíveis compostos promissores a agentes terapêuticos para o tratamento da esquistossomose mansoni.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial citotóxico *in vitro* e a atividade esquistossomicida *in vivo* dos derivados da série N-fenil-2-benzilideno-hidrazinacarbotiamida frente a *Schistosoma mansoni* adultos.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Verificar o potencial citotóxico de compostos com atividade da série N-fenil-2-benzilideno-hidrazinacarbotiamida em linhagem de macrófagos;
- Avaliar a modulação de tiazóis, tiossemicarbazonas e tiazolidinonas sobre a produção de óxido nítrico (NO) no sobrenadante de culturas de macrófagos;
- Investigar o potencial genotóxico de derivados tiazolidínicos da série N-fenil-2-benzilideno-hidrazinacarbotiamida em células de medula de camundongos;
- Averiguar o potencial hemolítico de derivados da série N-fenil-2-benzilideno-hidrazinacarbotiamida;

- Realizar o ensaio de toxicidade aguda dos compostos da série N-fenil-2-benzilideno-hidrazinacarbotiamida em camundongos;
- Testar e determinar a eficácia do tratamento *in vivo* com compostos da série N-fenil-2-benzilideno-hidrazinacarbotiamida;
- Verificar histologicamente o comportamento da fibrose hepática em camundongos infectados com *S. mansoni* pós-tratamento;
- Avaliar as alterações morfológicas dos vermes de *S. mansoni* obtidos do ensaio *in vivo*, de camundongos tratados com os compostos da série N-fenil-2-benzilideno-hidrazinacarbotiamida através da técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma doença presente em países em desenvolvimento e ligado a população de baixa classe econômica, que pode levar a problemas de saúde crônicos (WHO, 2020). Ainda de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), atualmente 240 milhões de pessoas estão infectadas com a Esquistossomose e mais de 700 milhões vivem em áreas endêmicas, ou seja, com risco eminente de contrair a doença.

Distribuídos ao longo de todos os continentes, vários são os agentes etiológicos que causam variações clínicas da esquistossomose na população, com destaque as espécies: *Schistosoma haematobium*, *S. guineensis*, *S. intercalatum*, *S. mekongi*, *S. japonicum*-e *S. mansoni*. Destas, a espécie *S. haematobium* causa a esquistossomose urogenital, e as demais, causam esquistossomose intestinais (WHO, 2020).

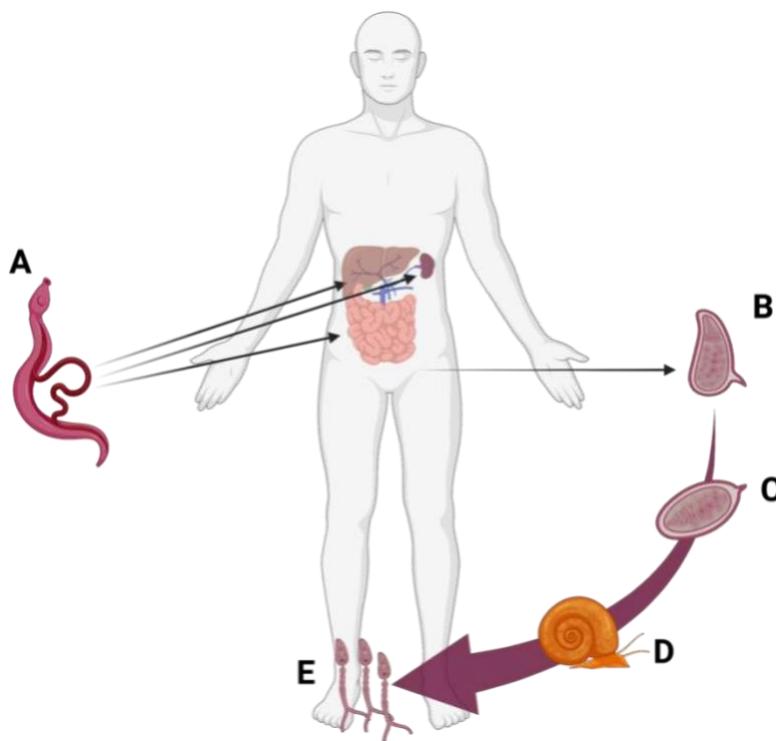
No Brasil, de acordo com o Ministério da Saúde (2020), o único agente etiológico é o *S. mansoni*, que apresenta uma manifestação intestinal, causando a doença conhecida como Esquistossomose mansoni, ou popularmente conhecida como xistose, doença do caramujo ou barriga d'água, em função da ascite, manifestação clínica mais característica da doença.

Epidemiologicamente, o Brasil conta com 1,5 milhões de pessoas em risco iminente de contaminação, pois estão em áreas endêmicas (BRASIL, 2020) e estima-se que 2 milhões de pessoas encontram-se infectadas, distribuídas em 19 estados do País (DUBEUX et al., 2019). Contudo, o Ministério da Saúde (2020) reconhece transmissão em apenas 18 estados, e os divide em áreas endêmicas e áreas de transmissão focal, pelos índices de positividade de 2009 a 2017.

Neste contexto, destacamos os nove estados em que temos transmissão endêmica da esquistossomose: Alagoas, Bahia, Pernambuco, Paraíba, Rio Grande do Norte, Sergipe, Minas Gerais e Espírito Santo. Onde, Pernambuco é o 2º estado do nordeste do Brasil com maiores índices de casos positivos para esquistossomose, atingindo índices de 15,3%, atrás apenas do estado de Alagoas, que apresenta o maior índice nacional de casos positivos entre os anos de 2008 e 2016, com 25,2% (BRASIL, 2018).

## 2.2 CICLO DE TRANSMISSÃO

**Figura 01 - Ciclo de Esquistossomose**



Fonte: Autor, 2022.

O ciclo (Fig. 1) tem início com uma pessoa infectada, onde, através das fezes destes indivíduos, **ovos (B)** de *S. mansoni* são liberados para o meio externo (CORREIA DO NASCIMENTO et al., 2018). Devido à falta de tratamento sanitário adequado nas áreas endêmicas, os ovos entram em contato com coleções d'água (rios, lagos, aquíferos) e as larvas ciliadas, miracídios, contidas nos ovos, eclodem (KATZ, 2017)

Os **miracídeos (C)** são larvas ciliadas que facilitam o processo de locomoção e são atraídos quimicamente por secreções de caramujos do gênero *Biomphalaria*, com destaque para as espécies *B. glabrata* e *B. straminea*, onde irão penetrar através das partes moles, com a finalidade de uma remodelação morfológica e multiplicação (AULA et al., 2021). Dentro do **caramujo (D)**, os miracídeos se transformam em sacos embrionários, chamados de esporocistos (KATZ, 2018). O esporocisto primário tem a finalidade de multiplicar a quantidade de cercarias que irão formar, durante a fase de esporocisto secundário.

As **cercarias (E)**, forma infectante ao hospedeiro definitivo, são formas evolutivas aquáticas, com características morfológicas marcantes: presença de uma cabeça contendo as informações genéticas e uma cauda, com a parte final bifurcada, responsável pelo processo de movimentação (CHAN et al., 2017). Elas penetram no corpo dos mamíferos através de contato epidérmico, quando os hospedeiros entram em contato com águas contaminadas. Após a penetração, perdem a cauda e se transformam em **esquistossômulos** (MATOS-ROCHA et al., 2019).

Duas a três semanas após a infecção inicial, os esquistossômulos acabam na circulação hepatoportal onde se desenvolvem em pares de **vermes adultos (A)** sexualmente maduros prontos para a reprodução sexuada. Posteriormente seis a oito semanas após a infecção, os casais migram para as veias mesentéricas, onde as fêmeas começam a produzir ovos, imaturos, dos quais cerca de 50% atravessam a parede do intestino grosso para alcançar o ambiente externo, expelido juntamente com o bolo fecal, reiniciando o ciclo de vida do parasita. No entanto, uma grande fração dos ovos se aloja na parede intestinal ou são transportados pelo fluxo sanguíneo para o fígado, onde ficam presos nos sinusóides hepáticos. Este acúmulo de ovos nos tecidos é a principal causa da patologia na esquistossomose (GIERA et al., 2018).

### 2.3 A ULTRAESTRUTURA DO *S. mansoni*

A ultraestrutura do *Schistosoma mansoni* é complexa. Externamente, é revestida por uma camada chamada de tegumento. Este tegumento é altamente especializado e desempenha várias funções, como proteção contra o sistema imunológico do hospedeiro, absorção de nutrientes e eliminação de resíduos. É composto por células tegumentares que se sobrepõem e estão intimamente associadas a estruturas musculares (KATZ, 2018).

O aparelho reprodutor do *Schistosoma mansoni* é diferenciado em machos e fêmeas. Os machos possuem um par de testículos, um canal deferente, uma vesícula seminal, um pênis e uma ventosa copulatória. As fêmeas possuem um par de ovários, um oviduto, uma bolsa de Mehlis, uma ooteca e um sistema glandular (GIERA et al., 2018). A fecundação ocorre no sistema ginecológico da fêmea, e os ovos são eliminados nas fezes do hospedeiro (CORREIA DO NASCIMENTO et al., 2018).

A digestão é realizada por um sistema gastrointestinal simples, composto por uma boca, faringe, esôfago, intestino e ânus. A boca é rodeada por uma ventosa (oral) que

ajuda a fixar o verme ao hospedeiro, enquanto a faringe e o esôfago são responsáveis por sugar sangue e outros nutrientes do hospedeiro (GIERA et al., 2018).

A musculatura do parasito é composta por camadas longitudinais e circulares de fibras musculares. Estas, são importantes para o movimento do parasito e a contração do tegumento, necessário para a absorção de nutrientes (MATOS-ROCHA et al., 2019).

## 2.4 A IMUNOLOGIA DA ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é considerada uma doença tropical, por estar presente e encontrar nesta região potencial para perpetuação, crônica e com potencial letal (COSTAIN, MACDONALD & SMITS, 2018). Os processos imunológicos ligados a esquistossomose são de interesse da comunidade científica uma vez que são imunomediados, ou seja, sofrem alterações de acordo, principalmente, com o tempo de infecção e os locais onde os indivíduos estejam (OSAKUNOR, WOOLHOUSE & MUTAPI, 2018).

Todos os estágios infectivos descritos no ciclo do parasita levam a uma resposta imune, contudo, o granuloma hepático que é o sinal histopatológico predominante na parasitose, apenas se forma com a presença do ovo (KALANTARI, BUNNELL & STADECKER, 2019). Com a migração do ovo, é estimulado um processo de angiogênese através de uma resposta do tipo Th2, fazendo com que haja um recrutamento de células e substâncias através de um processo inflamatório presente (OSAKUNOR, WOOLHOUSE & MUTAPI, 2018).

Aziz et al., (2022) descreveram os principais tipos de linfócitos T com a presença de antígenos específicos em cada etapa da infecção: A presença de IL-12 secretada por células dendríticas e macrófagos fazem com que o início do processo de formação do granuloma e a modulação posterior da resposta Th2.

Com o avanço da infecção e o aumento da secreção destes imunocomplexos, são incorporados a presença de interleucinas (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, IL-17, IL-21, IL-22, IL-23, IL-10) (AZIZ et al., 2022) e a produção de outras substâncias, como TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  (KALANTARI, BUNNELL & STADECKER, 2019).

## 2.5 TRATAMENTO

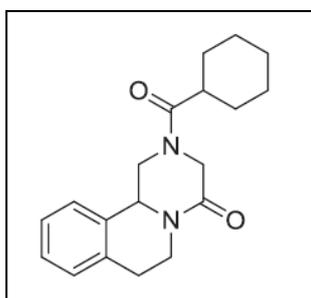
### 2.5.1 O Praziquantel e a Oxaminiquine (OXA)

A quimioterapia é o meio mais comum para o tratamento de doenças infecto-parasitárias. O Ministério da Saúde utiliza o Praziquantel (PZQ) para o tratamento de pessoas infectadas com esquistossomose mansoni (BRASIL, 2020). Este medicamento é o fármaco de primeira escolha para o tratamento de infecções por *S. mansoni* e outros cestóides (SILVA et al., 2017).

A história do PZQ começa nos anos 1970 com o desenvolvimento do medicamento pela Bayer® a partir de relatos de falhas terapêuticas e diversos efeitos adversos da Oxaminiquine (OXA). A OXA foi o medicamento primeiro utilizado no tratamento da esquistossomose, porém atualmente é empregada apenas quando há problemas na administração do PZQ. Somente após aproximadamente 10 anos da sua produção, começou-se a utilização do PZQ em seres humanos, no início da década de 80 (SILVA et al., 2017).

O PZQ utilizado atualmente é um derivado tetracíclico de tetrahydroisoquinolina administrado como uma mistura racêmica ((±) -PZQ), o que dificulta bastante o tratamento, pois apenas um dos estereoisômeros apresenta atividade anti-helmíntica, contudo, a separação não é feita pelo alto custo. A fórmula química do PZQ utilizado atualmente é (±)-2-cyclohexanecarbonyl 1H,2H,3H,4H,6H,7H,11bH-piperazino[2,1-a]isoquinolin-4-one, (SILVA et al. 2017) (Fig. 02).

**Figura 02** - Fórmula estrutural do Praziquantel.



Fonte: SILVA et al. (2017)

O PZQ de acordo com o Sistema de Classificação de Biofármacos da Food & Drug Administration (FDA), é classificado como Classe 2, ou seja, um fármaco com baixa solubilidade e alta permeabilidade (VALE et al., 2017).

A literatura é clara quanto a ação do PZQ sobre influxos de Ca<sup>+</sup> e posteriormente paralisa espástica de vermes adultos e vacuolização rápida da superfície tegumentar do verme, contudo, o mecanismo de ação do PZQ ainda não foi totalmente elucidado, necessitando assim estudos voltados para tais temáticas (PARK et al., 2019).

### 2.5.2 As problemáticas do PZQ

O praziquantel é utilizado em escala global para o tratamento da esquistossomose há aproximadamente 40 anos. Países endêmicos como o Brasil utilizam ciclos repetitivos de PZQ em sua população, seja de maneira pontual ou nos tratamentos em massa, na tentativa de controlar a disseminação e tratar os grandes números de reinfetados (SILVA et al., 2017).

Vale et al. (2017) destrincha a estrutura farmacológica do PZQ em 3 partes: O PZQ1 seria a parte responsável pela atuação frente ao *S. mansoni*; PZQ2 (principal molécula com atividade biológica) e o PZQ3 que não apresenta participação efetiva contra o *S. mansoni*.

A porção PZQ3 seria a responsável pelo gosto amargo que é característico do medicamento, dificultando a administração em crianças, grupo etário bastante atingindo e com altos índices de reinfecção, não sendo ainda, disponível no mercado uma versão pediátrica voltada para este grupo prioritário, facilitando assim sua administração. (VALE et al., 2017). Katz (2018) em inquérito epidemiológico nacional realizado, demonstrou um número expressivo de crianças e adolescentes em idade escolar afetados pela esquistossomose.

Além dos problemas supracitados com o tratamento, estudos sobre a ação do PZQ em outras formas evolutivas do *S. mansoni* demonstraram a ineficácia do medicamento frente a formas juvenis (ALVES-JUNIOR et al., 2019), onde a viabilidade de tais formas tratadas com PZQ não apresentaram diferenças significativas comparadas a solução utilizada como controle no experimento o Dimetilsulfóxido (DMSO).

Diante das limitações do PZQ e por ser a principal formulação farmacológica usada para o tratamento da esquistossomose, a busca por novos agentes terapêuticos se tornou uma necessidade global (ALVES-JÚNIOR et al., 2019).

De acordo com as estatísticas mundiais em saúde da OMS (2015), apenas 10% do total de investimentos em prospecção de novos fármacos está diretamente ligado às doenças que atingem 90% da população mundial, como as parasitoses.

## 2.6 ATIVIDADE BIOLÓGICA DE NOVOS COMPOSTOS

### 2.6.1 Tiazóis, tiossemicarbazonas e tiazolidinonas

Atualmente, uma grande quantidade de fármacos que são produzidos e utilizados são oriundos de estudos de substâncias naturais, obtidos através de processos de biotecnologia ou são frutos de modificações moleculares a fim de torná-los mais seletivos, menos tóxico e com melhoria no metabolismo (MIKOVSKI et al., 2018).

Tiossemicarbazonas, tiazolidinas e tiazolidinonas são compostos que possuem um amplo perfil farmacológico por apresentarem um núcleo preservado e uma grande possibilidade de inserções e modificações nos radicais, aumentando assim o seu amplo espectro em estudos da Química Medicinal (ABEED et al., 2017; SIQUEIRA et al., 2019). Relata-se que as primeiras pesquisas com Tiossemicarbazonas foram realizadas nas décadas de 20, contudo, os primeiros fármacos foram utilizados em 1950 onde apresentavam ação frente a bactérias causadoras da tuberculose e da hanseníase (CZUBATKA-BIEN´KOWSKA et al., 2017).

Hussein et al. (2015) descreveram as tiossemicarbazonas como compostos de esqueleto básico  $R_1R_2C=N-NH-CS-NR_3R_4$ , onde podem ser feitas inserções de radicais a fim de obter atividade ou melhorá-la. Czubatka-Bien´Kowska et al. (2017) descreve que a atividade das tiossemicarbazonas depende diretamente do átomo ou radical ligado ao nitrogênio terminal.

Através destas modificações ou inserções de novos átomos ou radicais na cadeia, a prospecção de novos compostos foi se difundindo durante a última década, levando a um crescimento exponencial a estudos com diversos alvos biológicos, onde se destacam várias atividades (CZUBATKA-BIEN´KOWSKA et al., 2017).

A atividade antitumoral é um dos grandes pontos de pesquisas da atividade de tiossemicarbazonas. Estudos de Wang et al. (2011); Subhashree et al. (2017), Oliveira et

al. (2017) e Siqueira et al. (2019) demonstram atividades frente a diferentes linhagens de células tumorais.

Tiossemicarbazonas também foram utilizados na tentativa de debelar infecções virais. Em 1963 foi utilizado N-metilisatina tiossemicarbazona na formulação de um medicamento para o tratamento da varíola. O composto foi denominado como Marboran® foi primeiramente utilizado na Índia, contudo, após a formulação de uma vacina efetiva, o medicamento foi retirado de utilização por conta dos efeitos adversos (BERALDO, 2004). Em 2020, diante de todo quadro pandêmico, o poder antirretroviral do Marboran® foi testado frente ao Sars-Cov-2 e demonstrou que o medicamento teve uma interação com mais de 2 proteínas do Covid-19 (SHAH; MODI; SAGAR, 2020).

As tiazolidinonas são uma classe privilegiadas de compostos, pois detém a uma grande capacidade de atividades biológicas (JOSHI; MAHAJAN & CHEJARA, 2020). Uma das muitas aplicabilidades das tiazolidinas é frente a microorganismos, levado principalmente pelo perfil de resistência de bactérias frente aos antimicrobianos utilizados na terapia atualmente (ALHAMEED et al., 2020).

Outras atividades relacionadas a tiossemicarbazonas, tiazolidinas e tiazolidinonas são: antiinflamatória (BARROS et al., 2010), anti-microbiana (TOMASIC et al., 2011; PEREIRA et al., 2019; PAIVA et al., 2019), anti-*Tripanossoma cruzi* (MOREIRA et al., 2013; ESPÍNDOLA et al., 2015; KRYSHCHYSHYN et al., 2019), antifúngica (ARAÚJO NETO et al., 2020), antidiabética (ABEED et al., 2017), anticâncer (SZYCHOWSKI et al., 2017).

Alguns trabalhos também demonstraram a atividade de derivados de tiazóis frente ao *Schistosoma mansoni*, como os estudos de SILVA et al. (2013); SANTIAGO et al. (2014); PEREIRA et al. (2019), OLIVEIRA-JÚNIOR et al. (2019) e ROCHA et al., (2022), contudo, estudos sobre a eficácia de tiazolidinas e tiazolidinonas frente ao parasito precisam ser incentivados.,

Os trabalhos desenvolvidos até o momento, utilizando-se destes compostos frente ao *S. mansoni* demonstram a eficácia *in vitro*, sendo poucos os trabalhos publicados *in vivo*, necessitando assim, estudos que teste sua atividade e eficiência em modelos experimentais *in vivo*, garantindo assim a eficácia e segurança dos pró-fármacos.

### **2.6.2 Derivados tiazolidínicos da série N-fenil-2-benzilideno-hidrazinacarbotiamida**

A série foi desenhada com 05 tiossemicarbazonas (JF30, JF31, JF33, JF34 e JF42), 05 tiazolidinonas (JF35, JF36, JF38, JF39 e JF43) e 06 tiazóis (NJ16, NJ17, NJ18, NJ20, NJ22 e NJ23). Os códigos JF e NJ seguem a padronização do Laboratório concedente das moléculas.

Todos os compostos foram testados *in vitro* e obtiveram resultados promissores frente a parasitos jovens e adultos (ROCHA et al., 2022), fazendo com que se tornassem promissores em testes *in vivo* na tentativa de formulação de novas alternativas terapêuticas.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para os experimentos foram utilizados camundongos *Swiss webster* com 30g, machos, autorizados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães, registrado sob a licença CEUA 142/2019. Para a infecção, foi utilizada a cepa de *S. mansoni*, LE (Belo Horizonte), mantida no Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE.

Os camundongos foram submetidos à infecção através de protocolos de infecção estabelecido no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE. Os camundongos foram infectados com carga parasitária de 80 cercarias por 1h. O período da infecção dos camundongos até a formação de vermes adultos foi de aproximadamente 45 dias, controlado pela presença de ovos de *S. mansoni* nas fezes dos animais.

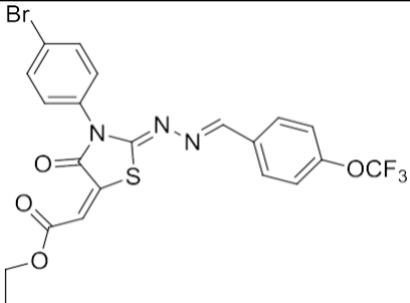
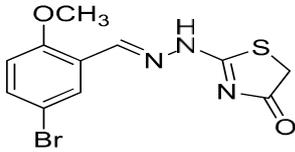
#### 3.2 MOLÉCULAS UTILIZADAS NO ESTUDO

As tiossemicarbazonas, tiazolidinas e derivados tiazóis da série N-FENIL-2-BENZILIDENO-HIDRAZINACARBOTIAMIDA foram submetidos a testes preliminares de atividade esquistossomicida *in vitro*.

A partir destes ensaios foram selecionados os compostos JF31, JF43 e NJ22, pois obtiveram 100% de atividade frente ao *S. mansoni*, seguindo para os demais testes *in vitro* e *in vivo*.

Quadro 1 – Código, nomenclatura e estrutura química dos derivados utilizados no estudo.

COD.	DERIVADO	ESTRUTURA
JF31	N-(4-bromofenil)2-(4-(metilsulfonil)benzilideno)-hidrazinacarbotiamida	

JF43	etil-2-((Z)-3-(4-bromofenil)-4-oxo-2-((E)-(4-trifluorometóxi)benzilideno)hidrazona)-tiazolidin-5-ilideno) acetato	
NJ22	2-(2-(5-bromo-2-metóxi-benzilideno)hidrazinil)-tiazol-4(5H)-ona	

Fonte: Laboratório de Química e Inovação Terapêutica – LqIT/UFPE

### 3.3 VERIFICAÇÃO DO POTENCIAL CITOTÓXICO EM MACRÓFAGOS J774A.1.

As análises de citotoxicidade foram realizadas através da técnica do MTT, descrita por Mosmann (1983). Para tal, macrófagos J774A.1 foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos JF31, JF43 e NJ22 (12,5µg/mL a 200µg/mL) por 24h. Em seguida lavadas em meio RPMI e incubadas a uma concentração de 5mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído no próprio meio, por 3h a 37°C. Posteriormente, as células foram solubilizadas em DMSO (100µl/poço) e a absorbância medida a 540nm em espectrofotômetro Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). Os ensaios foram realizados em quadruplicata em dois experimentos independentes.

### 3.4 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) NO SOBRENADANTE DE CULTURAS MACROFÁGICAS J774A.1.

A produção de óxido nítrico foi medida indiretamente através da determinação do nitrito acumulado no sobrenadante de culturas de macrófagos J774A.1 (GREEN et al., 1982). As amostras e o padrão foram colocados em placas de cultura de células, diluídas em meio RPMI 1640 + 5% de SBF. Em seguida, foi adicionado o reagente de GRIESS (1% sulfanilamida, 0,1% naftiletlenodiamina em 3% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, nas proporções de 1:1). As

placas sofreram incubação de 10 minutos ao abrigo da luz. A leitura foi realizada a 540nm em leitor de ELISA. A quantidade de NO foi calculado a partir de curva padrão obtidas com concentração de 12,5 a 200 $\mu$ M.

### 3.5 INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO

Para a aferição do potencial genotóxico foi empregada a técnica do micronúcleo (SCHMID, 1975). Tal estudo consiste na detecção de aberrações cromossômicas em células de medula óssea de camundongos. Os camundongos foram pesados e marcados individualmente, e foram administrados: os compostos JF31, JF43 e NJ22 na dose de 200mg/Kg, o controle negativo (DMSO) via gavagem e a ciclofosfamida (CPA) via intraperitoneal como controle positivo, na concentração de 25 mg/kg. Após 24 horas, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical. Em seguida, os fêmures foram extirpados, dissecados, cortadas às epífises proximais e processada a técnica de micronúcleos.

As lâminas foram colocadas para secar a temperatura ambiente por 1h, posteriormente fixadas em metanol por 10min. Após 24h da fixação, as lâminas foram coradas seguindo a bateria: 3min em leishman puro; 15min em leishman diluído em água destilada (1:6); 6 banhos em água destilada; 15min em acetona e 15min em xilol. Em seguida, secas à temperatura ambiente e analisadas em microscopia óptica (10x100X) para detecção dos micronúcleos e diferenciação em eritrócitos normocromáticos (NCE) e policromáticos (PCE).

### 3.6 POTENCIAL HEMOLÍTICO

Foram utilizados eritrócitos humanos O+ para averiguação do percentual hemolítico de acordo com o protocolo de Becerra et al., (2012). Utilizou-se 2mL de sangue total homogeneizados + 18 mL de solução salina. O material foi centrifugado a 2.500 rpm por 2 min à 25°C. O sobrenadante desprezado e repetido por 2x. Em seguida, foram adicionados 200 $\mu$ L do sedimento de eritrócitos + 9.800 $\mu$ L de salina. Os compostos JF31, JF43 e NJ22 foram diluídas em DMSO, e posteriormente sofreram diluição seriada. Foram adicionados 100 $\mu$ L de cada concentração de cada molécula em quadruplicata técnica em placa de fundo U. Foram utilizados solução salina como controle negativo e Triton X-100 como controle positivo.

Subsequentemente, foram acrescentadas 100µL de solução eritrocitária (2%) em cada poço. A placa foi incubada por 3 horas, à 37°C e sob agitação constante (35 rpm). Posteriormente, a placa sofreu centrifugação a 3500 rpm por 4 min, com temperatura de 25°C, os sobrenadantes foram retirados e adicionados a placas 96 poços fundo chato e realizou-se leitura da absorbância a 540 nm no espectrofotômetro Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). O percentual foi obtido através da razão: (absorbância da molécula – absorbância do CN) / (absorbância do CP – absorbância do CN) x 100.

### 3.7 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA

Para aferição da toxicidade aguda, foram utilizados camundongos *S. webster* sadios, machos, com idade média de 30 dias. Os animais foram divididos randomicamente em grupos de 05 animais de acordo com os protocolos OECD/OCDE - 425/2008 - OECD Guidelines for the Testing of Chemicals Acute Oral Toxicity – Up-and-Down- Procedure (UDP), com modificações. A dose preconizada foi de 10x a dose utilizada nos experimentos *in vivo* (2000mg/Kg). Os camundongos foram pesados e marcados individualmente, a fim de que se pudesse calcular a diferença de peso entre os grupos pós-administração. Foram inoculados via gavagem os compostos JF31, JF43 e NJ22 e uma solução salina (PBS), utilizada como veículo para administração das moléculas, como controle negativo.

Após a administração, os camundongos foram observados por 1, 2, 4, 8 e 12h e a cada 24h por um período de 15 dias. Foram observados os seguintes parâmetros:

PARÂMETROS	OBSERVAÇÕES
Pele	C.A (Com Alterações) S.A (Sem Alterações)
Olhos e membranas mucosas	
Sinais cardíacos e respiratórios	
Padrão de comportamento	
Atividade motora	O (Observado) N.O (Não Observado)
Salivação	
Tremores	
Convulsões	
Letargia	
Sonolência	
Coma	
Morte	
Necrópsia	C.M (Com Modificações) S.M (Sem Modificações)

Após 15 dias, os animais foram pesados individualmente para que pudesse se observar a variação de peso e, em seguida, os animais foram eutanasiados por sobre dose anestésica Ketemina (100 mg/Kg) + Xilazina (10 mg/Kg) para visualização de modificações macroscópicas nos órgãos (rim, fígado e baço) quanto ao tamanho, coloração e texturas.

### 3.8 TESTE DA SUSCETIBILIDADE *in vivo* DE VERMES ADULTOS DE *S. mansoni* FRENTE AOS DERIVADOS N-FENIL-2-BENZILIDENO-HIDRAZINACARBOTIAMIDA

Os ensaios *in vivo* para determinação da atividade esquistossomicida dos derivados N-fenil-2-benzilideno-hidrazinacarbotiamida foram realizados com os compostos JF31, JF43 e NJ22. Foram utilizados grupos formados por 06 camundongos. A distribuição dos camundongos aos grupos experimentais deu-se por um esquema randômico. Os camundongos foram tratados por via oral após 45 dias de infecção, por um período de 05 dias. A dose preconizada dos derivados de tiazol, tiossemicarbazonas e tiazolidinonas foi de 200 mg/Kg, em função dos ensaios *in vitro* (PICA-MATTOCCIA; CIOLLI, 2004) e do praziquantel (fármaco utilizado como controle positivo) foi de 60 mg/Kg, sendo a dose padrão utilizada pelo Ministério da Saúde.

Após o tratamento, os animais foram eutanasiados para determinação do número de vermes residuais e sua carga parasitária pós-tratamento. O grupo controle negativo recebeu o veículo utilizado para solubilizar os compostos (DMSO) na mesma concentração utilizada para a diluição dos compostos (5%), respeitando o volume máximo de 0,1mL/10g de peso do animal. A partir dos experimentos *in vivo*, foram realizados testes complementares, como a contagem e classificação dos ovos presentes no intestino (Oograma), contagem dos ovos presentes no fígado e intestino pela técnica de Cheever, avaliação histopatológica da fibrose hepática e avaliação da morfologia dos vermes expostos ao tratamento através da microscopia eletrônica de varredura, conforme os protocolos descritos a seguir.

### 3.9 TÉCNICA DO OOGRAMA

O intestino total de cada animal foi pesado e três fragmentos da porção distal do intestino foram lavados em solução salina, posteriormente 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) (PELLEGRINO et al., 1962).

### 3.10 CONTAGEM DOS OVOS NO FÍGADO E INTESTINO

Após a retirada de um fragmento de 1 cm<sup>2</sup> do fígado dos animais para estudo histológico e morfométrico e da porção distal do intestino para o oograma, os órgãos remanescentes foram pesados e colocados em tubos falcon contendo hidróxido de potássio (KOH) a 4% para digestão (CHEEVER, 1970). Os ovos encontrados foram quantificados com o auxílio da câmara de contagem de células “Sedgewick Rafter” (Graticules Limited: modelo S50, Tonbridge - England).

### 3.11 DETERMINAÇÃO DA EFICÁCIA DO TRATAMENTO

A avaliação da eficácia dos compostos da série N-fenil-2-benzilideno-hidrazinacarbotiamida e do praziquantel foi determinada através da redução da percentagem da carga parasitária em cada grupo tratado utilizando a equação:

$$\text{Redução de vermes (\%)} = \frac{(\text{n}^\circ \text{ de vermes no grupo controle} - \text{n}^\circ \text{ de vermes no grupo tratado})}{\text{n}^\circ \text{ de vermes no grupo controle}} \times 100$$

### 3.12 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DOS GRANULOMAS HEPÁTICOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *S. mansoni*

O fígado total dos animais foi pesado e para caracterização das lesões hepáticas, fragmentos de fígado medindo 1 cm<sup>2</sup> foram fixados em formalina tamponada (10%), incluídos em parafina e cortados (4 µm) em micrótomo. Os cortes foram corados pela hematoxilina-eosina. Todos os granulomas periovulares centralizados por ovos, cascas de ovos ou vermes, presentes nos campos selecionados, confluentes ou não, foram avaliados.

Para efeito de cálculo estereológico, foram considerados os granulomas esquistossomóticos como estrutura esferóides, apresentando distribuição normal de tamanho. Os dados obtidos foram utilizados para o cálculo da área seccional ocupada. A quantificação de tecido fibroso hepático foi obtida através das secções hepáticas coradas

por Tricrômico de Masson e foi diretamente medida e calculada, como um percentual do total da área examinada.

### 3.13 ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL

Os vermes adultos obtidos após a eutanásia dos animais que foram tratados com os compostos JF31, JF43 e NJ22, foram processados de acordo com rotina padrão para MEV no Laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA. Primeiramente foram lavados em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M, pH 7.2, em seguida fixados em tampão cacodilato de sódio a 0,1 M e glutaraldeído a 2,5%. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,1 M por 90 min. Em seguida foram realizadas três lavagens em tampão cacodilato 0,1 M para posterior desidratação, utilizando série crescente de etanol a 30%, 50%, 70%, 90% e 03 vezes de 100% por 10 minutos cada etapa. Após a desidratação foi realizado o ponto crítico para a substituição do etanol por dióxido de carbono, obtendo-se o material desidratado para montagem em *stubs* metálicos utilizando uma fita dupla face de carbono. Em seguida, o material foi metalizado numa atmosfera de uma fina camada de ouro, para visualização e análise no microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-5600 LV do Laboratório de Microscopia Eletrônica do iLIKA.

### 3.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas de citotoxicidade foram feitas por regressão linear no programa IBM SPSS Statistics 25 para Windows.

Para análise da produção de óxido nítrico, genotoxicidade e atividade esquistosomicida *in vivo* foram feitas análises de significância ( $p < 0.05$ ), através do teste ANOVA e o pós-teste de Tukey no programa GraphPad Prism 5 para Windows.

A análise de componentes principais (PCA) foi realizada para verificar possíveis agrupamentos, eliminar redundâncias e definir as variáveis mais importantes durante a separação dos grupos experimentais. Para isso, os dados foram transformados (variando) para padronização devido a diferentes magnitudes de escala. O nível de importância de cada variável foi determinado pelos valores do vetor próprio (McGarigal et al., 2000), com valores substanciais de correlação determinados para cada atributo em relação aos principais componentes (PC) 1 e 2.

O nível de importância de cada PC foi determinado pelo método Broken-stick, onde valores próprios que excediam os valores esperados foram mantidos para interpretação. As análises foram realizadas no software Fitopac 2.1.2.85 (Shepherd, 2010).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS J.774A1 E POTENCIAL DE HEMÓLISE

O estudo para avaliação da citotoxicidade em macrófagos J.774A1, indica que o composto mais promissor da série foi o JF31, pois apresentou um índice de CC50 mais alto, 219,82 $\mu$ M. O composto JF43 apresentou valor de CC50 de 57,41 $\mu$ M, enquanto o composto NJ22 apresentou índice de 70,35 $\mu$ M, conforme a Tabela 1. O controle positivo (PZQ) teve como valor de CC50 340,48 $\mu$ M.

Os valores do potencial hemolítico variaram de 0,04 (controle negativo) até 1,42 (controle positivo), conforme a Tabela 2. Dentre as moléculas testadas, o composto JF31 foi o que apresentou a menor taxa de hemólise de 0,22 na concentração de 200  $\mu$ g/ML. Este valor não tem diferença estatística para o Praziquantel (PZQ), utilizado como parâmetro de confiabilidade por ser o fármaco atualmente utilizado no tratamento da esquistossomose.

Os compostos JF43 e NJ22 na concentração de 200  $\mu$ g/mL, não apresentaram diferença estatística comparada ao controle positivo, enquanto o composto JF31 apresenta os menores valores para a concentração dos testes *in vivo*. 0,22% não apresenta diferença estatística significativa quando comparado ao controle negativo e ao PZQ, que é o medicamento utilizado atualmente para a quimioterapia da esquistossomose.

Os controles foram utilizados em diferentes concentrações, sendo próximos os valores encontrados, a média do grupo foi apresentada na tabela abaixo:

Percebeu-se que, de acordo com o comportamento nas concentrações testadas, o potencial hemolítico não se mostrou dose dependente, ou seja, o aumento ou diminuição do quantitativo não foi um fator preponderante para oscilações constantes.

**Tabela 1** – Citotoxicidade em Eritrócitos e Células de Macrófagos J774A.1

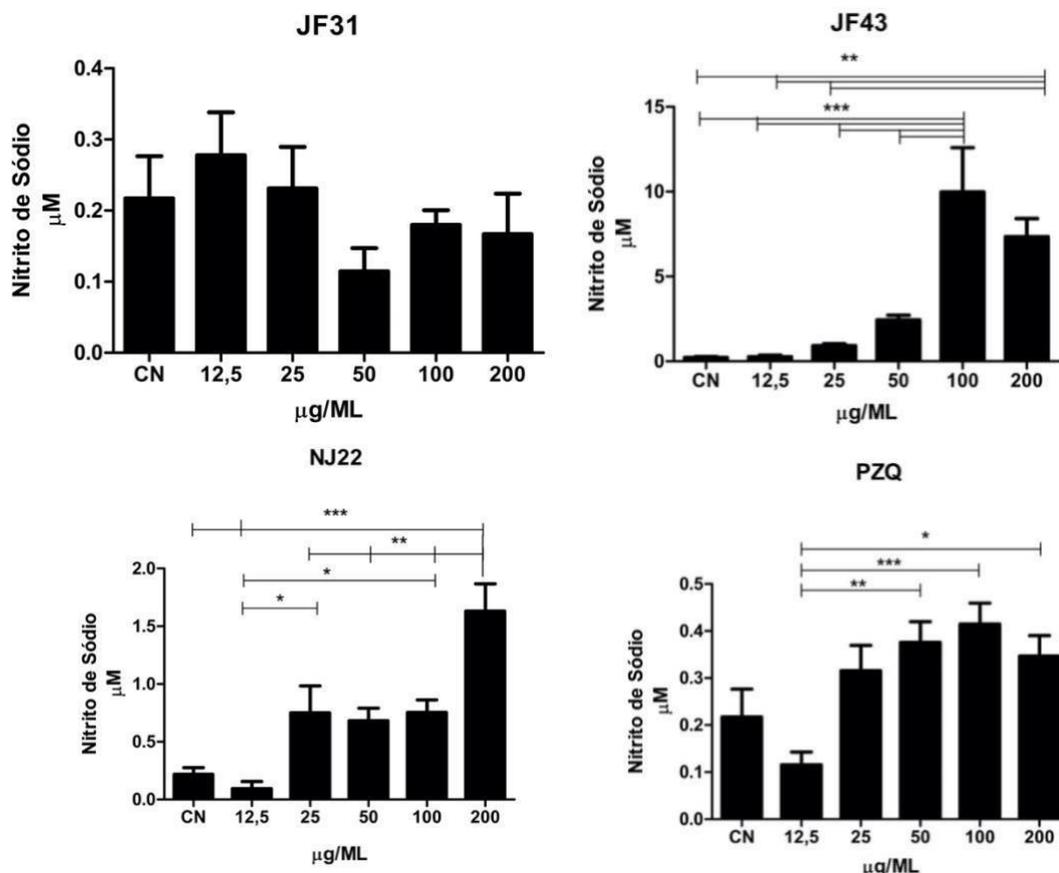
GRUPOS TESTES	PERCENTUAL HEMOLÍTICO (%) ( $\mu\text{g/mL}$ )					CC <sub>50</sub> J774A.1 ( $\mu\text{M}$ )
	200	100	50	25	12,5	
<b>JF31</b>	0,22 $\pm$	0,07 $\pm$	0,10 $\pm$	0,11 $\pm$	0,11 $\pm$	219,82
	0,30	0,13	0,14	0,13	0,13	
<b>JF43</b>	1,89 $\pm$	0,13 $\pm$	0,16 $\pm$	0,12 $\pm$	9 $\pm$	57,41
	0,39	0,24	0,18	0,10	24,92	
<b>NJ22</b>	1,07 $\pm$	0,50 $\pm$	0,24 $\pm$	0,29 $\pm$	0,07 $\pm$	70,35
	0,29	0,28	0,15	0,25	0,13	
<b>PZQ</b>	0,11 $\pm$	0,22 $\pm$	0,10 $\pm$	0,23 $\pm$	0,16 $\pm$	340,48
	0,22	0,18	0,22	0,24	0,19	
<b>CONTROLE NEGATIVO</b>	04 $\pm$ 0,001					
<b>CONTROLE POSITIVO</b>	1,42 $\pm$ 0,39					

Fonte: Autor, 2022.

#### 4.2 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Sobre a produção de óxido nítrico, foram realizadas medições indiretas através da quantificação de nitrito de sódio. Conforme a figura 3, os compostos JF43 e NJ22 apresentaram diferença estatística significante para a quantificação de nitrito de sódio. JF43 nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{M}$ , enquanto NJ22 apresentou nas concentrações de 50 a 200 $\mu\text{M}$ . O composto JF31 apresentou perfil de produção semelhante ao PZQ, sendo ambos poucos produtores de tal substância.

**Figura 3** - Gráficos de nitrito de sódio para quantificação de óxido nítrico.



Legenda:  $p < 0,0001$

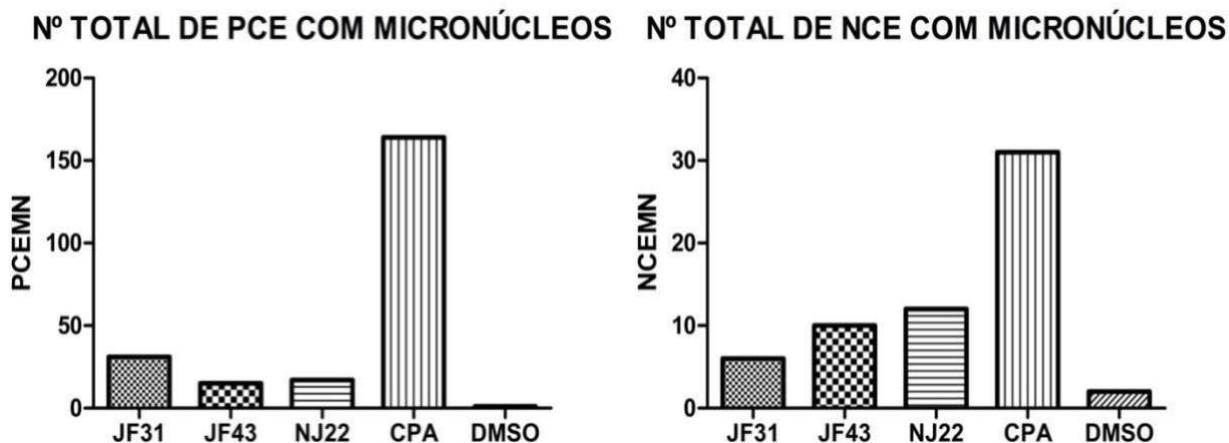
Fonte: Autor, 2022

#### 4.3 POTENCIAL GENOTÓXICO

Foram analisadas 2.000 células por animal, totalizando 10.000 células por grupo, distinguindo-as em PCE e NCE, observando cuidadosamente a presença ou não de possíveis fragmentos compatíveis com micronúcleos. Ao final da contagem, o grupo JF31 apresentou um total de 33 PCEMN e 06 NCEMN; os números do composto JF43 foram de 15 PCEMN e 10 NCEMN; já o composto NJ22 apresentou 17 PCEMN e 12 NCEMN, conforme a figura 10.

O grupo controle negativo (DMSO) apresentou um índice baixo de formação de micronúcleos, com apenas 01 PCEMN e 02 NCEMN. O grupo controle positivo ciclofosfamida (CPA) demonstrou a confiabilidade dos experimentos, apresentando 164 PCEMN e 31 NCEMN, conforme a fig. 4 abaixo:

**Figura 4** – Número de eritrócitos policromáticos (PCE) e normocromáticos (NCE) com micronúcleos.



Fonte: Autor, 2022.

#### 4.4 TOXICIDADE AGUDA

##### 4.4.1 Análise dos parâmetros físicos e comportamentais

Após a administração dos compostos JF31, JF43 e NJ22 na dose de 2000 mg/Kg, os animais foram acompanhados a fim de estabelecer a influência deles em parâmetros comportamentais e físicos, como descrito na tabela 3:

Tabela 2 – Parâmetros e Tempos de Análise para a detecção de Toxicidade Aguda

PARÂMETROS	TEMPOS DE OBSERVAÇÃO			
	DE 0 A 12H	DIA 01 A DIA 05	DIA 06 AO DIA 10	DIA 11 AO DIA 15
Pele	S.A	S.A	S.A	S.A
Olhos e membranas mucosas	S.A	S.A	S.A	S.A
Sinais cardíacos e respiratórios	S.A	S.A	S.A	S.A
Padrão de comportamento	S.A	S.A	S.A	S.A
Atividade motora	S.A	S.A	S.A	S.A
Salivação	N.O	N.O	N.O	N.O
Tremores	N.O	N.O	N.O	N.O
Convulsões	N.O	N.O	N.O	N.O
Letargia	N.O	N.O	N.O	N.O
Sonolência	N.O	N.O	N.O	N.O
Coma	N.O	N.O	N.O	N.O
Morte	N.O	N.O	N.O	N.O
Necrópsia*	-	-	-	-

S.A = Sem alterações; N.O = Não observado.

\* A necrópsia foi realizada ao final do 15º dia de observação, posteriormente a pesagem.

Nenhuma alteração foi observada, garantindo assim que os compostos não têm uma toxicidade aguda, garantindo assim uma segurança na utilização, uma vez que a dose alvo do estudo é 10 vezes menor do que a administrada nos grupos testes.

#### 4.4.2 Mudanças de peso/grupo

Os animais foram pesados antes da inoculação dos compostos e ao 15º dia, antes da eutanásia, a fim de verificar possíveis alterações de ganho ou perda de peso. Em nenhum grupo houve perda de peso e os índices de incremento não ultrapassaram valores de  $\pm 20\%$ , conforme a tabela 4 e a figura 5.

Tabela 3 – Médias de Peso Pré e Pós-Tratamento para Detecção de Toxicidade Aguda

	MÉDIA DE PESO PRÉ- INOCULAÇÃO (g)	MÉDIA DE PESO PÓS- INOCULAÇÃO (g)	% DE INCREMENTO DE PESO
<b>JF31</b>	30,8 $\pm$ 0,84	32,4 $\pm$ 2,07	6,5%
<b>JF 43</b>	32,4 $\pm$ 1,81	35,6 $\pm$ 2,70	9,9%
<b>NJ 22</b>	31,6 $\pm$ 1,14	36,2 $\pm$ 1,48	14,5%
<b>(SALINA)</b>	31,2 $\pm$ 1,30	31,8 $\pm$ 1,48	2%

Fonte: Autor, 2022

**Figura 5** – Gráfico de incremento de peso no teste de Toxicidade Aguda

Fonte: Autor, 2022.

#### 4.4.3 Alterações morfológicas pós eutanásia

Após o 15º dia de observação, os animais foram eutanasiados por sobredose anestésica (Ketamina + Xilazina), e tiveram a cavidade abdominal exposta a fim de observar possíveis diferenças de coloração, tamanho e texturas macroscópicas nos principais órgãos (fígado, baço, rins).

Em nenhum grupo teste (JF31, JF43 e NJ22) foram observadas alteração dos órgãos em análise, mantendo o tamanho, coloração e texturas iguais. No grupo controle negativo (salina), observou-se um pequeno aumento no tamanho do baço e no tamanho do rim, porém o fígado manteve-se com tamanho e texturas convencionais.

#### 4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *in vivo*.

##### 4.5.1 Determinação da eficácia do tratamento

Para a determinação da eficácia do tratamento, 06 animais tiveram o sistema porta-hepático perfundidos para a recuperação de vermes, assim como tiveram as alças intestinais avaliadas para a visualização e contagem dos vermes presentes. Os vermes foram classificados em machos (M), fêmeas (F) e casais (C).

No grupo NJ22, foram recuperados 8C + 2M, somando 18 vermes. Já para o composto JF31, foram recuperados 14C + 1F, totalizando 29 vermes. O grupo JF43 totalizou 74 vermes recuperados, sendo 37C. No grupo controle positivo (PZQ), foram recuperados 4C + 1M, tendo como número final 9 vermes.

Todos os índices foram comparados com o grupo controle negativo (DMSO), que foram recuperados 28C, totalizando 56 vermes.

O composto JF31 apresentou uma eficácia de 48,21% no tratamento *in vivo*, enquanto o composto NJ22 obteve índices de 67,86%. Dentre os grupos testes, apenas o composto JF43 não apresentou redução no quantitativo de vermes recuperados quando comparado ao grupo controle negativo em 32,14%. O grupo controle positivo garantiu a confiabilidade dos dados, obtendo uma eficácia de 83,93%.

#### **4.5.2 Contagem de ovos pela técnica de Cheever**

Após a digestão dos fígados e intestinos, foram contados os ovos presentes conforme a tabela 5. Levando em consideração o fígado, o composto que apresentou uma menor quantidade relativa de ovos foi o composto JF31, com uma média 116,5 ovos e 53,76 ovos/g de órgão. Já analisando o intestino, o mais eficaz na diminuição do quantitativo de ovos foi o composto JF43, apresentando uma média de 26,25 ovos e 6,74 ovos/g. Estatisticamente (Fig. 7), não há diferença entre o composto JF31 e o PZQ quando comparados os números de ovos presentes no fígado; também não há diferença entre o composto JF43 e o PZQ quando comparado a média de ovos no intestino.

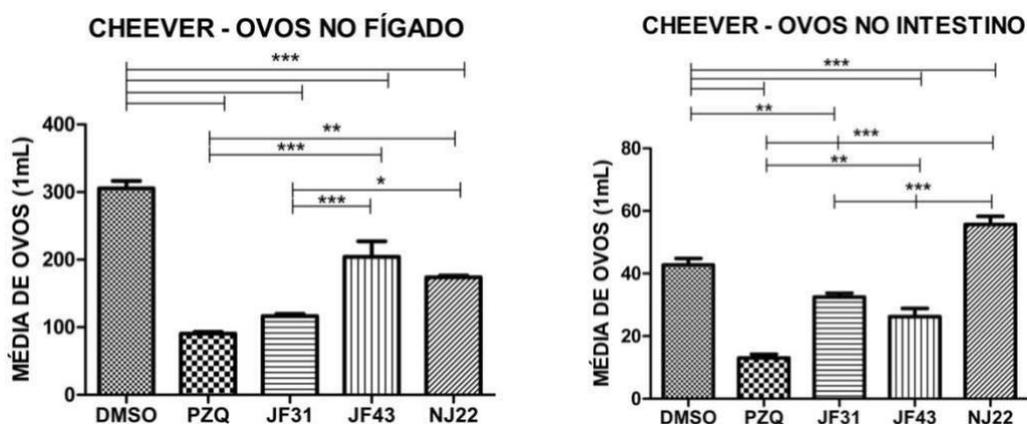
Os controles positivos e negativos apresentaram respectivamente, médias de ovos de 90,37 e 305,58 no fígado. Analisando os intestinos, as médias foram de 13 ovos no controle positivo e 42,25 ovos no controle negativo.

Tabela 4 – Contagem de ovos nos fígados e intestinos e correlação com as médias de peso dos órgãos.

	FÍGADO			INTESTINO		
	MÉDIA DE OVOS	MÉDIA PESO DO ÓRGÃO (g)	MÉDIA DE OVOS (g)	MÉDIA DE OVOS	MÉDIA PESO DO ÓRGÃO (g)	MÉDIA DE OVOS (g)
<b>JF31</b>	116,5±10	2,17±0,14	53,76	32,5±4	4,18±0,29	7,7
<b>JF43</b>	204±76	2,77±1,25	87,93	26,25±8	3,89±0,69	6,74
<b>NJ22</b>	173,80±8	2,21±0,20	78,71	55,7±7	4,45±0,54	12,51
<b>PZQ</b>	90,37±7	2,1±0,39	43,03	13±3	3,51±1,13	3,70
<b>DMSO</b>	305,58±36	2,19±0,43	139,32	42,75±6	4,32±0,28	9,90

Fonte: Autor, 2022.

Figura 6 – Contagem de ovos pela técnica de Cheever.



Legenda:  $p < 0,0001$

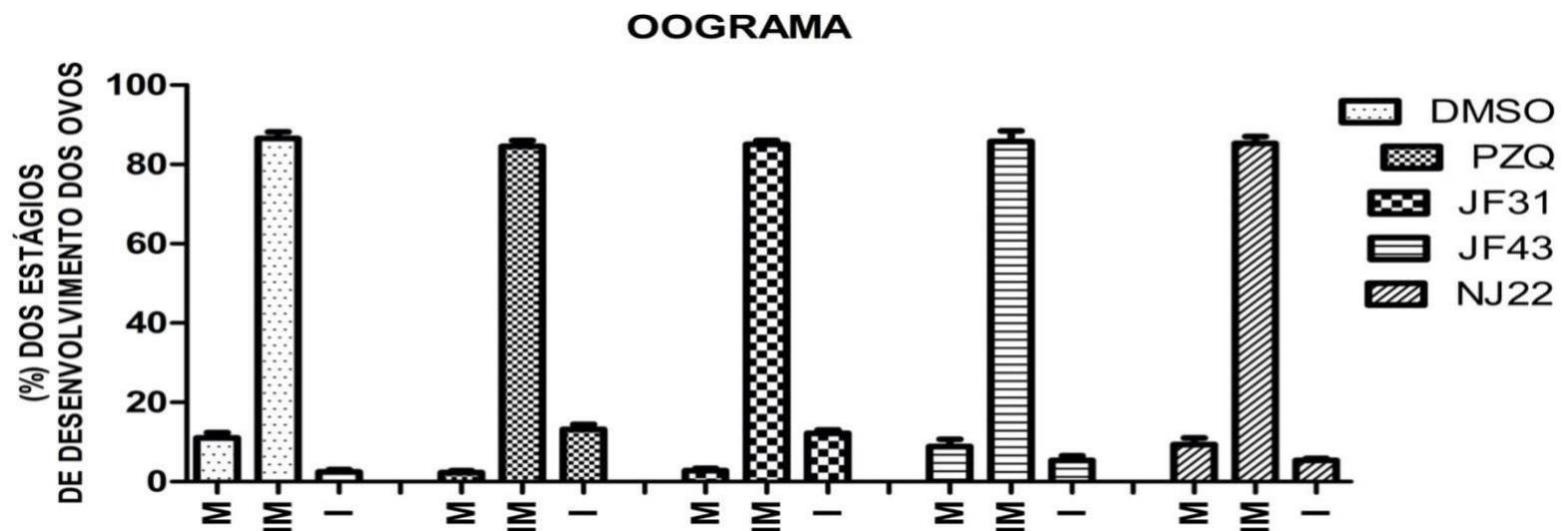
Fonte: Autor, 2022.

#### 4.5.3 Contagem e classificação de ovos pela técnica do Oograma

As porções do intestino foram analisadas em microscopia óptica a fim de classificar os ovos presentes em maduros (M), imaturos (IM) e inviáveis (Fig. 8). Os compostos JF43 e NJ22 apresentaram os maiores índices de ovos maduros, com 8,9% e 9,38% respectivamente, não apresentando diferença estatística para o DMSO. Quanto aos ovos inviáveis, ambos obtiveram a taxa de 5,33%, acima do índice de 2,44% obtidos pelo controle negativo.

Diferente dos demais compostos, o JF31 apresentou um índice de 2,83% de ovos maduros e 12,16% de ovos inviáveis. Estes números não apresentam diferença estatística quando comparados ao controle positivo, que apresentou índices de 2,33% e 13,22% para ovos maduros e inviáveis respectivamente.

Figura 7 – Classificação dos ovos pela técnica do Oograma



Distribuição de ovos maduros (M), imaturos (IM) e inviáveis (I) nos grupos testes e controles.

Fonte: Autor, 2022.

## 4.6 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA FIBROSE HEPÁTICA

### 4.6.1 Perfil dos granulomas hepáticos

Os fígados avaliados mostraram presença de células inflamatórias crônicas localizadas, apresentando células epitelióides e células gigantes multinucleadas conhecido como granulomas os quais foram contados e analisados a fim de verificar a média das áreas ocupada.

Observamos a formação de granuloma na região periovular de ovos viáveis, inviáveis e cascas (Fig. 9), como também, em vermes de *S. mansoni* aprisionados (Fig. 9 - D) no fígado, que não migraram para o sistema porta-hepático ou para os ramos esplênicos.

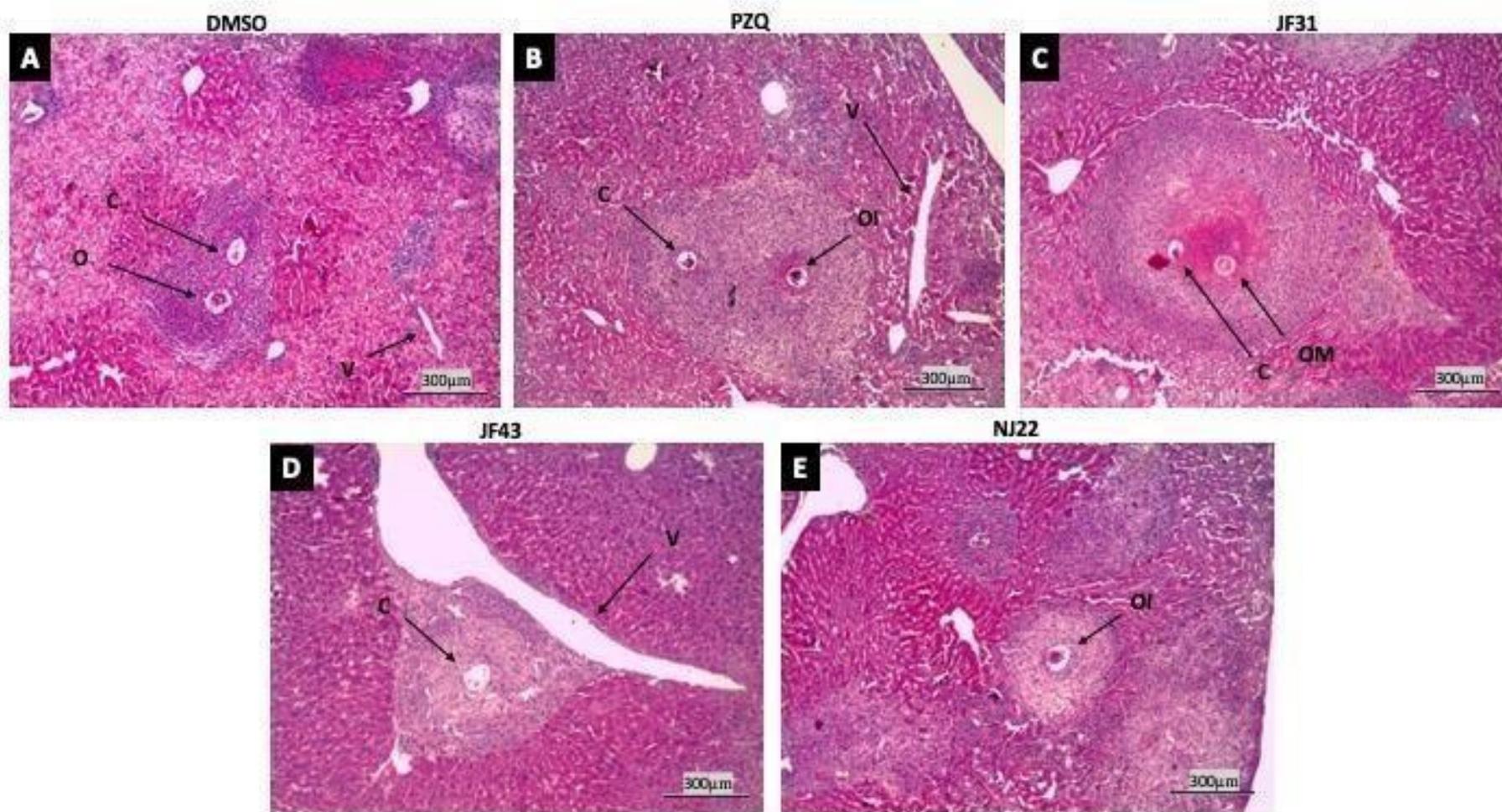
Na imagem 9 - A, os camundongos tratados com o controle negativo apresentaram granulomas com hepatócitos preservados, com alteração nos vasos sinusóides (entre os hepatócitos). No controle positivo, ovos inviáveis foram aprisionados pelo sistema imunológico (Fig. 9 - B), evidenciando assim uma grande alteração morfológica dos hepatócitos e uma grande quantidade de vasos sinusóides, em especial aos vasos sanguíneos presentes no órgão.

Os grupos JF31 e NJ22 não apresentaram alterações significativas nos hepatócitos, conforme as Fig. 9 - C e E, respectivamente. Vasos sinusóides evidentes foram identificados em regiões próximas aos granulomas e aos vasos sanguíneos. A migração dos parasitos em diferentes estágios é característica da esquistossomose, contudo, é raro analisar a presença de vermes dentro do tecido hepático, conforme a Fig. 9D. Identificamos um verme macho em corte longitudinal e um verme em corte seccional, próximo de estruturas ligadas ao aporte sanguíneo do órgão. Hepatócitos em morfologia normal e poucos vasos sinusóides.

O grupo que apresentou a menor área de granulomas foi o grupo NJ22 (Fig. 9 - E), com uma média de  $87.772,371\mu\text{m}^2$ . Em seguida veio o grupo JF31 (Fig. 9 - C) com uma média de  $98.929,852\mu\text{m}^2$ . O grupo JF43 (Fig. 9 - D) obteve uma média de  $106.265,264\mu\text{m}^2$ .

Estatisticamente, não houve diferença entre os grupos testados comparados ao Praziquantel (Fig. 9 - B) que apresentou uma média de  $100.680,352\mu\text{m}^2$ . O grupo controle negativo apresentou área de  $99.669,095\mu\text{m}^2$ .

Figura 8 – Perfil dos granulomas hepáticos dos grupos teste e controles.

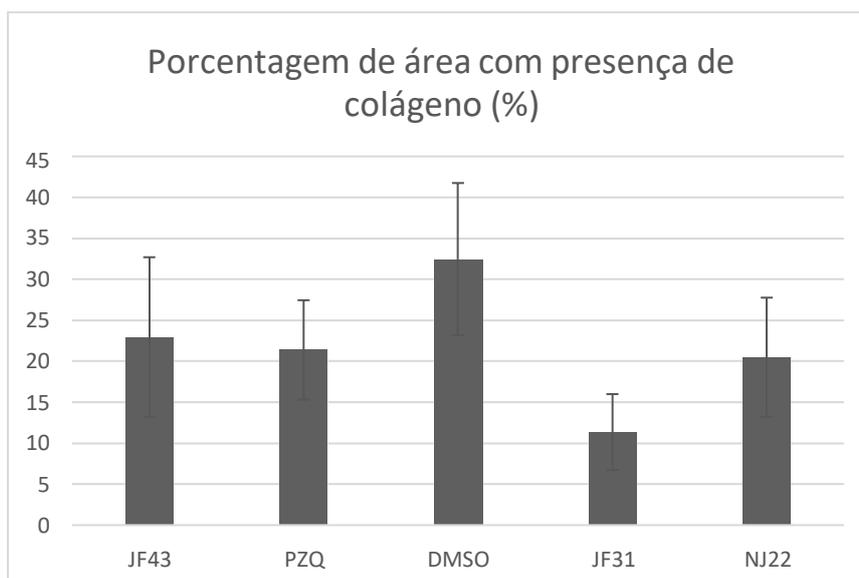


Granulomas hepáticos corados em Hematoxilina-Eosina (HE). Legenda: C – cascas de ovos; O – ovo; V – veia; OI – ovo imaturo; OM – ovo maduro.

Fonte: Autor, 2022

Analisando a deposição de colágeno, o grupo que apresentou a menor área, foi o grupo JF31 com uma média de  $11 \pm 4,63\%$  (Fig. 10), seguido pelo grupo NJ22 com  $20 \pm 7,28\%$  e o grupo JF43 com  $23 \pm 9,73\%$ . O controle positivo obteve um índice de  $21 \pm 6,08\%$  e o controle negativo, o maior índice, com  $32 \pm 9,29\%$ . Apenas o grupo JF31 apresentou diferença estatística significativa quando comprado ao grupo controle negativo.

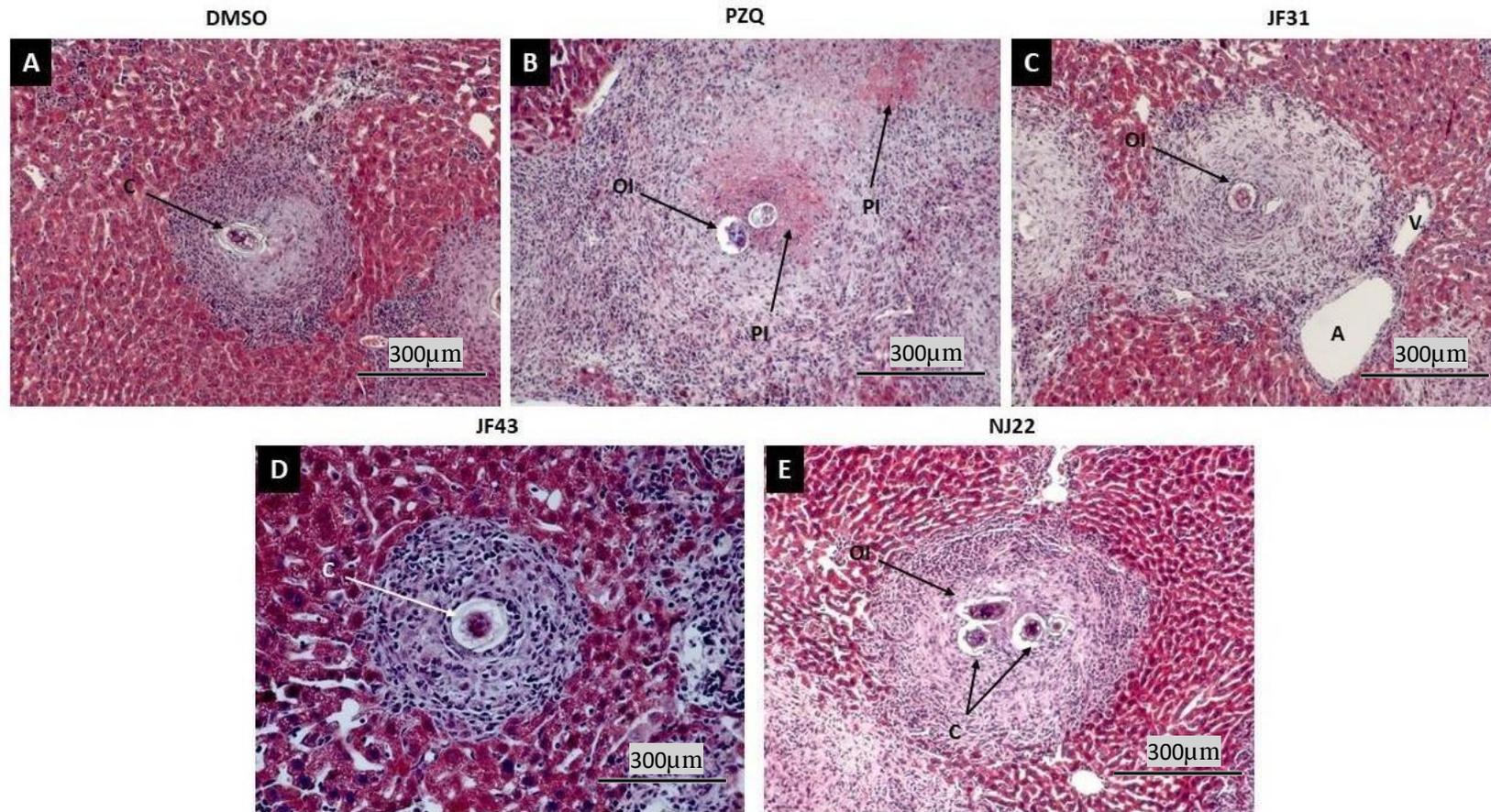
Figura 9 – Análise da deposição de colágeno.



Fonte: Autor, 2022.

As deposições de colágeno através da coloração de Tricrômico de Manson, e foram percebidos perfis diferentes nos grupos testes e grupos controles (Fig. 11).

Figura 10 – Perfil de deposição de colágeno nos granulomas hepáticos dos grupos teste e controles.



Colágeno ao redor dos granulomas hepáticos corados com Tricrômico de Massom (TM). Legenda: C – casca de ovo; OI – ovo imaturo; PI – processo isquêmico; A – artéria; V – veia.

Fonte: Autor, 2022.

#### 4.7 AVALIAÇÃO ULTRAESTRUTURAL DOS VERMES DE *S. mansoni*

Os vermes obtidos pós-tratamento foram analisados para a verificação de alterações ultraestruturais. Os espécimes do grupo controle negativo não apresentaram alterações estruturais (Fig. 12). A musculatura está bem definida com a presença das rugas paralelas (RP) (Fig. 12 – B), tubérculos (T) preservados em quantidade e morfologia, além da presença das espículas (E) distribuídas de maneira uniforme (Fig. 12 – C).

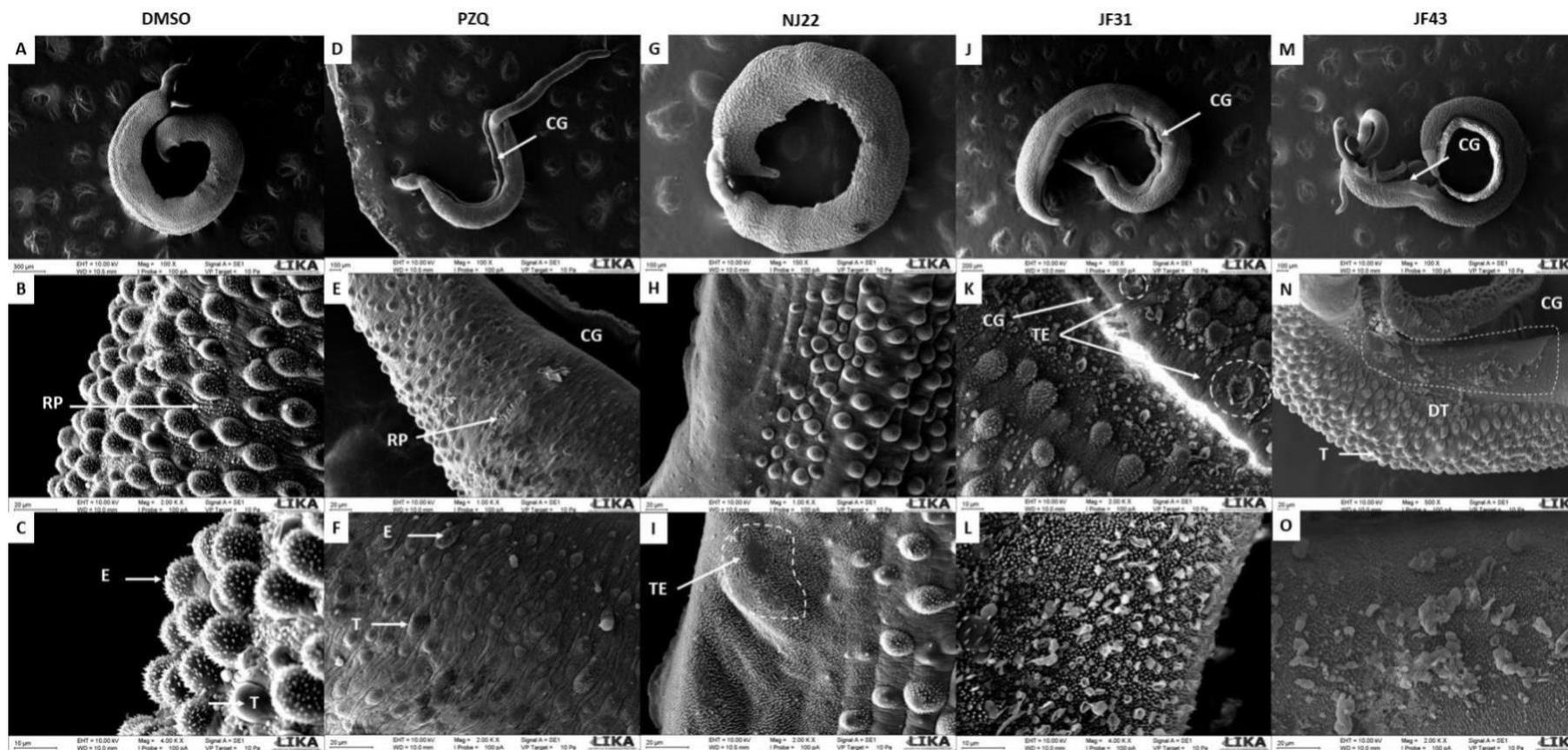
O grupo controle positivo demonstrou atividade do fármaco frente aos vermes com diversos aspectos ultraestruturais: eliminação das espículas e alterações morfológicas dos tubérculos (Fig. 12 – E, F).

nos vermes do grupo JF31, observou-se a presença de tubérculos estourados (TE) conforme a figura 12 (K), próximos ao canal ginecóforo (CG) do verme macho. Observou-se uma deposição de material nas estruturas tegumentares, impedindo que o parasito fique recoberto de material do hospedeiro (Fig. 12- L).

O composto JF43 agiu nos tegumentos dos vermes causando descamações tegumentares (DT) (Fig. 12 – K, L); enquanto o composto NJ22 demonstrou atividade frente ao tegumento dos vermes com a destruição de tubérculos (TE), presentes na fig. 12 – I.

Os vermes obtidos dos grupos testes encontravam-se contorcidos (Fig. 12 – G,J,M), diferente do encontrado no grupo controle positivo (Fig. 12 – D).

Figura 11 – Alterações ultraestruturais visualizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura



Coluna I - Vermes do grupo controle negativo (DMSO); Coluna II – Vermes do grupo controle positivo (Praziquantel); Coluna III – Vermes obtidos do grupo NJ22; Coluna IV – Vermes obtidos do grupo JF31; Coluna V – Vermes obtidos do grupo JF43. Legendas: RP – rugas paralelas; E – espículas; CG – canal ginecóforo; T – tubérculos; TE – tubérculos estourados; DT – descamação tegumentar.

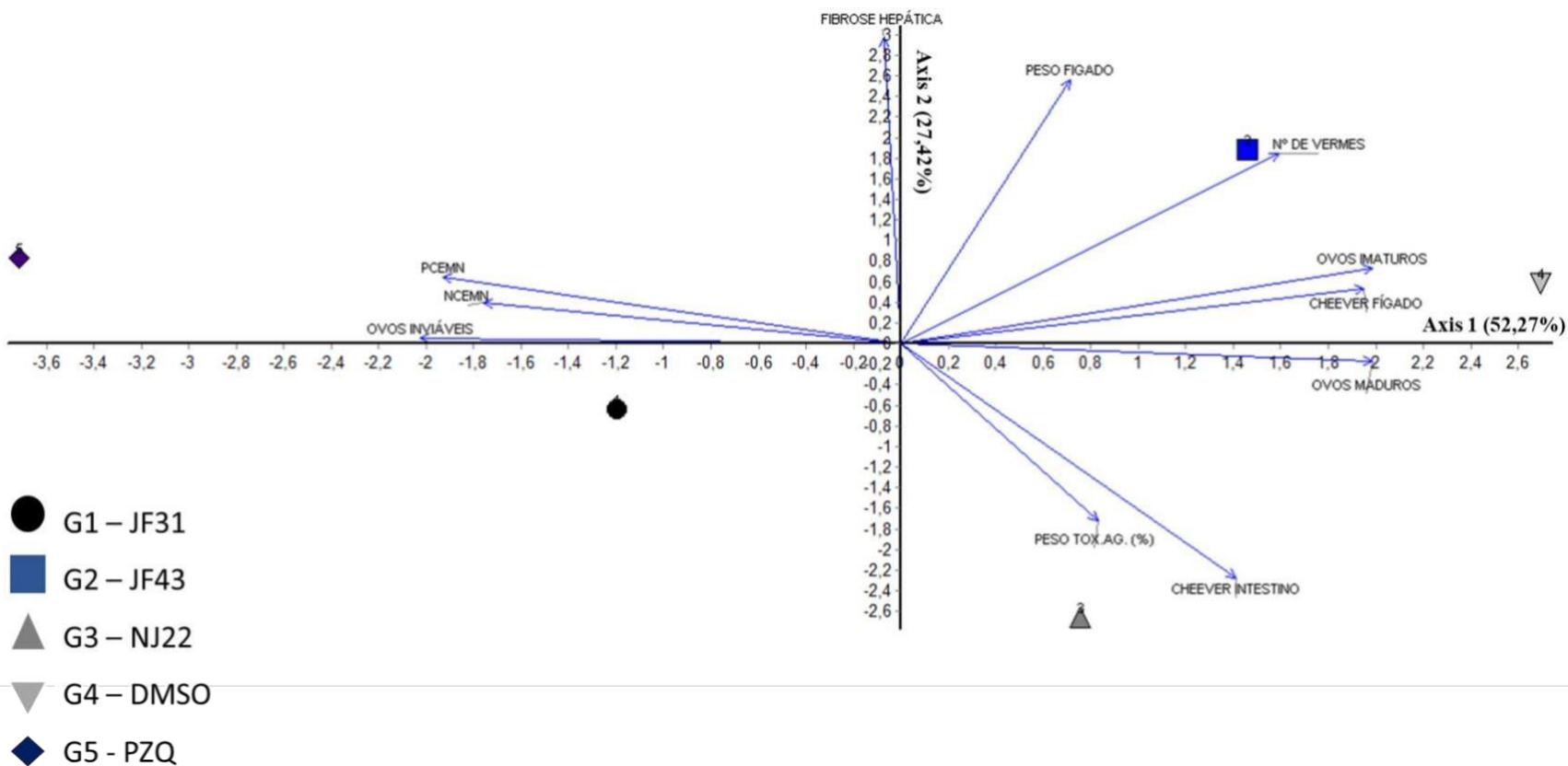
Fonte: Autor, 2022.

#### 4.8 ANÁLISE DE COMPONENTES PRINCIPAIS – PCA

A variação total dos dados foi de 79,69%, com os atributos mais importantes do grupo com valores de correlação  $> 0,6$  (Figura 18). Para PC1 (eixo horizontal), os atributos mais relevantes e seus valores de correlação foram número de vermes (0,2994), PCEMN (-0,3624), NCEMN (-0,3308), Ovos maduros (0,3729), ovos imaturos (0,3731), ovos inviáveis (-0,3803), Cheever fígado (0,3660), Cheever intestino (0,2656).

No PC2 (eixo vertical), os parâmetros responsáveis pela separação dos tratamentos foram Peso Tox. Ag. (%) (-0,3225), Peso do fígado (0,4805), Número de vermes (0,3465), Cheever intestino (-0,4279), fibrose hepática (0,5584).

Figura 12 – Análise de Componentes Principais – PCA dos grupos teste e controles.



Fonte: Autor, 2022.

## 5 DISCUSSÃO

O composto JF31 é uma tiossemicarbazona que apresenta o grupamento metilsulfonil no anel heterocíclico. Este grupo apresenta uma série de características como: é um grupo polar, ou seja, apresenta uma separação de cargas elétricas em sua estrutura além de possuírem alta afinidade nas estruturas de aminoácidos presentes nas enzimas associadas aos sítios ativos, favorecendo assim o processo farmacodinâmico. Também é capaz de doar um próton em solução aquosa; apresenta boa reatividade, sendo um bom grupo de saída em reações de substituição nucleofílica e solúvel em solventes polares.

O composto JF43 é uma tiazolidina que tem no anel heterocíclico um trifluorometóxi substituído. Este grupo é considerado funcional, altamente polar, estável e reativo, com efeito eletrônico negativo e alta solubilidade em solventes polares. De acordo com seus estudos, os grupos tiazolidinas fornecem uma estrutura-base capaz de fornecer aceptores de hidrogênio, bem como ligar-se a estruturas aromáticas substituídas que participam especificamente com os sítios ativos (ABDELLATIF et al., 2016).

O composto NJ22 é uma tiazolidinona que apresenta um grupamento carbonila no anel tiazolidínico. O grupamento carbonila é encontrado em diversos compostos orgânicos, como aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos, ésteres, amidas, entre outros. Os três compostos compartilham do elemento oxigênio (O) nos substituintes.

A busca por novos agentes com atividade frente ao *S. mansoni* é um dos grandes desafios da química medicinal. Segundo Santos et al., (2020), a descoberta de novos fármacos para a esquistossomose é tardia, fazendo com que estratégias químicas como o reposicionamento e descoberta de novos compostos sejam utilizados. Nesta perspectiva, alguns fármacos já utilizados no tratamento de outras parasitoses estão sendo remodelados quimicamente na tentativa de obter-se fármacos com ação esquistossomicida (MOREIRA et al., 2022).

Os compostos tiazolidínicos tem um amplo espectro de atividade biológica pela versatilidade que apresentam (SIDDIQUI et al., 2019; PRAJAPATI, PATEL, 2019). Conforme a sua mudança estrutural e o tipo celular utilizado, diferentes níveis de citotoxicidade podem ser alcançados, como demonstraram Matesanz et al., (2018), quando sintetizaram complexos unindo derivados de tiossemicarbazonas com paádio e

platina, observando uma citotoxicidade dose dependente frente a linhagens de células tumorais de leucemia, pulmão e ossos.

JF43 e NJ22 apresentaram índices de citotoxicidade moderados em macrófagos J774A.1, com índices de 57,41 $\mu$ M e 70,35 $\mu$ M, respectivamente. O composto JF31 apresentou baixa toxicidade (219,82 $\mu$ M) frente às células. Estes achados corroboram com os números encontrados por Matesanz et al., (2021) que ao utilizar derivados tiazólicos ligados com unidades heterocíclicas frente a células tumorais HL-60 e MCF-3, obteve resultados de 43 e 76 $\mu$ M. Em linhagens de células VERO, o valor de CC<sub>50</sub> foi de 100 $\mu$ M, demonstrando assim que pode haver variação nos níveis de citotoxicidade quando utilizam padrões celulares distintos.

Estudos de Queiroz et al., (2020), demonstram que a citotoxicidade dos compostos tiazolidínicos JW-16.2, JW-37.2, GT-12 e GT-14 (tiossemicarbazonas e tiazóis) em macrófagos peritoniais variou entre 31,80 e 196,38 $\mu$ M. Em nossos estudos, foram utilizadas culturas de macrófagos e os índices obtidos variaram de 43 a 219,82 $\mu$ M, corroborando assim com a literatura que compostos que contém derivados de tiazóis apresentam índices de CC<sub>50</sub> confiáveis.

Estes resultados também estão expressos no trabalho de Silva et al., (2017), quando 07 aryl-tiossemicarbazonas foram sintetizadas e tiveram o seu potencial citotóxico analisado em macrófagos peritoneais. Ao final do estudo, os autores obtiveram índices de CC<sub>50</sub> a partir de 111,8 $\mu$ M, até >333,2 $\mu$ M. Estes números demonstram que os compostos da série se aproximam dos valores já descritos na literatura para estas classes de moléculas.

Macrófagos são células de grande importância, pois quando ativadas, participam ativamente dos processos inflamatórios, produzindo inúmeros subprodutos como, por exemplo, o óxido nítrico (ZHANG et al., 2019). De acordo com Shen et al., (2017) quando estudaram a implicância do NO sobre espécimes de *Schistosoma*, essa substância teve a capacidade de diminuir a evolução da infecção por *S. japonicum*, atuando principalmente na respiração mitocondrial e dificultando a metabolização de colesterol.

Em seu estudo, Queiroz et al. (2020) demonstraram a boa produção de óxido nítrico por tiossemicarbazonas e tiazóis de macrófagos peritoneais. Estes índices variaram em macrófagos sadios e infectados com *L. infantum* e os índices foram estatisticamente significativos na maior concentração testada (100 $\mu$ g/mL). Estes resultados vão em

consonância com os nossos achados que demonstraram que a tiazolidinona JF43 e o tiazol NJ22 tiveram uma boa produção de NO, ratificando ainda mais a importância de tais compostos frente a infecções parasitárias.

Outro potencial citotóxico analisado foi a genotoxicidade frente a células de medula óssea de camundongos. Relatos na literatura dessa abordagem com novos agentes com potencial parasitário não são relatados.

Para a averiguação do potencial genotóxico, existem diferentes técnicas, como por exemplo, análise de células da medula óssea, cultivo de linfócitos e macrófagos. Zani et al., (2017), através de um teste de cometa, descreveu que a tiossemicarbazona V (S-4-isopropenylcyclohexen-1-carbaldehydethiosemicarbazone) não apresenta potencial genotóxico, enquanto a tiossemicarbazona T (Bis(S-4-isopropenylcyclohexen-1-carbaldehydethiosemicarbazonato)nickel(II)) apresentava um potencial genotóxico 1h após a administração do composto, contudo, não houve alteração da viabilidade de células U937, linhagem celular utilizada pois mostrou-se menos sensível do que células normais aos efeitos tóxicos das novas moléculas em teste.

A atividade antimicrobiana e hemolítica de compostos tiazolidínicos foi o objeto de estudo de Singh et al., (2016) que demonstrou que semicarbazonas (série SC) e tiossemicarbazonas (série TS) apresentaram potenciais hemolíticos variando entre 3.21% e 32.01%. Estes dados se aproximam aos encontrados por Marques et al., (2020), onde tiazóis e tiossemicarbazonas apresentaram potencial hemolítico entre 4 e 5%. Estes dados corroboram com os encontrados em nossos estudos, onde os compostos tiazolidínicos obtiveram índices entre 0.22% e 1.89%, sendo bem mais baixos do que os encontrados nestes estudos citados com compostos da mesma classe, como as tiossemicarbazonas; ou derivados, como as semicarbazonas.

Após as análises de citotoxicidade em diversos tipos celulares, a eficácia do tratamento *in vivo* foi um dos fatores abordados por Oliveira Barbosa et al., (2019) no teste de 9 tiazóis (1, 2a, 2e, 2f, 2g, 2k, 2l, 2m e 2n) frente ao *S. mansoni* em dois diferentes estágios de vida (esquistossômulo e vermes adultos). Após uma rodada de tratamentos com o composto 2m (2-[4-(2,4-dichlorophenyl)thiazol-2-ylamino]isoindoline-1,3-dione) obtiveram um número de 2 casais (4 vermes) para 5 doses consecutivas e 9 casais (18 vermes) para um tratamento com dose única. Essa redução também é observada no nosso trabalho, onde o tratamento com os compostos JF31 e NJ22, utilizando 5 doses

consecutivas, tiveram uma recuperação de 29 e 18 vermes, respectivamente, índices abaixo do controle negativo.

Resultados promissores também foram descritos por Amorim et al., (2020), quando testaram o composto GPQF-108 (derivado tiazolidínicos) em dose única de 400mg/Kg *in vivo* e obtiveram uma eficácia de tratamento em torno de 54%. Estes números corroboram com os nossos achados, onde a eficácia variou de 48,21 a 67,86%, com destaque a eficácia do tratamento *in vivo* com tiazol NJ22, onde no nosso estudo foi o composto que obteve o maior índice de eficácia no tratamento, com uma redução de 67,86%, demonstrando assim o grande potencial deste grupo como promissor para tratamentos *in vivo* da esquistossomose mansoni.

Extratos orgânicos também são testados com a finalidade da verificação de atividades biológicas diversas. Oliveira et al., (2017) demonstraram que extratos de etanólicos e hexânicos de *Phyllanthus amarus*, conhecida popularmente como quebra-pedra, obtiveram redução de 37,5 a 45,3% de redução no número de vermes recuperados através de perfusão do sistema porta-hepático e veias mesentéricas. Estes índices foram abaixo dos 48,21% encontrado em nossos estudos através do mesmo método de recuperação, podendo sinalizar que moléculas sintéticas podem apresentar eficácia *in vivo* superior aos testes com extratos orgânicos.

Diversos fatores são analisados para a determinação de uma boa eficácia de um composto frente ao *S. mansoni*: quantidade de vermes recuperados pós-tratamento, contagem de ovos em órgãos, análises ultraestruturais dos vermes obtidos e do perfil histológico dos granulomas.

Levando em consideração a quantidade de ovos recuperados no fígado e intestino, no nosso estudo foram encontrados mais ovos nos fígados (116,5 a 204) do que nos intestinos (32,5 a 55,7), não seguindo o mesmo perfil encontrado por Oliveira Barbosa et al., (2019) onde a tiossemicarbazonas 2m fez com que houvesse uma grande diferença no quantitativo de ovos recuperados (acima de 10.000 nos fígados e de 50.000 nos intestinos), mesmo o tempo de incubação para os experimentos sendo o mesmo (45 dias) e a quantidade de cercarias utilizadas para a infecção, serem em ambos, 80 cercarias.

Quando analisados os ovos em seus estágios de maturação pela técnica do oograma, os estudos de Guerra et al., (2018) utilizando prometazina e o de Roquini et al., (2019) utilizando espironolactona, ambos em 05 doses consecutivas de 100mg/Kg

perceberam um decréscimo acentuado de 95,3% e 52,8% no número de ovos imaturos de *S. mansoni*. Contudo, não havia diferença estatística significativa na quantidade de ovos mortos ou inviáveis. Seguindo a mesma metodologia, os nossos dados não corroboram com tais achados, uma vez que não houve diferença estatística significativa na quantidade de ovos inviáveis.

Contudo, se ainda tomarmos por base os estudos de Guerra et al., (2018) e Roquini et al., (2019), percebemos que não existe diferença estatística nos ovos mortos, divergindo dos achados em nossos estudos onde a tiossemicarbazonas JF31 inviabilizou 4,98 não apresentando diferença estatística para o PZQ que teve 5,41 vezes mais ovos inviáveis. A tiazolidinona JF43 e o tiazol NJ22 mataram 2,18 mais ovos que o controle negativo, sugerindo assim que estes compostos tenham uma maior eficácia na interrupção da cadeia de transmissão da esquistossomose pela não propagação de ovos com viabilidade.

O perfil dos granulomas hepáticos presentes no nosso estudo, demonstram a interação do sistema imunológico com fragmentos do parasita (ovos, cascas ou vermes). Llenerne, Helmbly (2021) descreveram o perfil dos granulomas hepáticos provocados por ovos de *S. mansoni* como largos e contendo uma grande quantidade de eosinófilos. O padrão eosinofílico não foi visualizado nos nossos achados, porém, os granulomas se apresentaram largos a partir das estruturas parasitárias encontradas.

Analisando o perfil de deposição de colágeno, Silva et al., (2016) observaram que a imizadolidina LPSF/PT-09 em doses de 250mg/Kg e 200mg/Kg não apresentaram diferença estatística significativa quando comparada aos controles positivos e negativos. Estes dados demonstram que o potencial do composto JF31 em ter uma deposição de colágeno abaixo dos controles é algo positivo uma vez que o granuloma e a deposição de colágeno são oriundos do processo inflamatório.

Com relação as alterações ultraestruturais causadas por tratamentos *in vivo* frente à vermes adultos de *S. mansoni*, a literatura é restrita e quando pesquisamos sobre a ação de compostos tiazolidínicos através de microscopia eletrônica, não há relatos na literatura, onde encontramos uma boa quantidade de trabalhos com a ação *in vitro* de compostos frente aos parasitas.

Pereira et al., (2019) em teste *in vitro* de 08 novos tiazóis perceberam que eles alteravam ultra estruturalmente a superfície dos vermes adultos de *S. mansoni*, através da formação de bolhas tegumentares, destruição de tubérculos e espículas e ação das

ventosas oral e ventral dos parasitos. Esta destruição pode ser visualizada parcialmente nos vermes tratados *in vivo* com a tiossemicarbazona JF31 e a tiazolidinona JF43.

Este mesmo padrão de descamação tegumentar apresentado pelo composto JF43 foi encontrado por Côrrea et al., (2019) quando vermes foram expostos ao PZQ. A perda de espículas em testes *in vitro* foi observado também por Almeida-Júnior et al., (2019), quando vermes adultos e jovens foram expostos ao PZQ e ao composto 2b (tiossemicarbazonas). A tiossemicarbazona JF31 também fez com que vermes adultos perdessem estas estruturas tegumentares nos estudos de Rocha et al., (2022) que demonstraram boa atividade *in vitro* destes compostos frente ao *S. mansoni*.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados encontrados e da relevância da prospecção de novos candidatos à fármacos com boa atividade esquistossomicida, os compostos da série N-FENIL-2-BENZILIDENO-HIDRAZINACARBOTIAMIDA apresentaram resultados promissores. A tiossemicarbazonas JF31 tem um nível de correspondência de 79,69% quando comparada ao PZQ, fazendo com que ela seja uma candidata à fármaco com boa atividade esquistossomicida, baixo potencial citotóxico, genotóxico e hemolítico; além de ter uma grande participação na inviabilidade de ovos, reduzindo a deposição de colágeno e o perfil dos granulomas hepáticos, e causando alterações ultraestruturais nos vermes.

O tiazol NJ22 também se apresentou como uma alternativa viável para a subsequente análise e formulação farmacológica. Assim como o composto JF31, este também se apresentou eficaz e seguro.

A tiazolidinona JF43, apesar de não ter apresentado uma boa eficácia no tratamento, pode ser melhorada na tentativa de formulação de um novo composto ainda menos citotóxico, preservando o seu não potencial genotóxico e com uma afinidade maior por eluentes orgânicos, como a água.

Mais estudos com as possíveis alterações causadas *in vivo* pelo tratamento de novos agentes esquistossomocidas é de suma importância para avaliar possíveis mecanismos de ação e elucidar novos métodos para possíveis alvos biológicos.

A necessidade de novos compostos com atividade esquistossomicida é uma emergência em saúde única, devendo ser incentivada na tentativa de frear os altos índices de infecção e mortalidade presente em diversos países ao redor do mundo. As doenças negligenciadas precisam de mais espaço nas indústrias farmacêuticas para que consigamos diminuir ou erradicar os impactos da desigualdade social e as suas repercussões na vida da população afetada.

## REFERÊNCIAS

ABDELLATIF, K. R. A. et al. Design, synthesis and biological screening of new 4-thiazolidinone derivatives with promising COX-2 selectivity, anti-inflammatory activity and gastric safety profile. **Bioorganic Chemistry**, v. 64, p. 1-12, 2016.

ABEED, A. A. O.; YOUSSEF, M. S. K.; HEGAZY, R. Synthesis, anti-diabetic and renoprotective activity of some new benzazole, thiazolidin-4-one and azetidin-2-one derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 11, p. 2054–2063. 2017

ALHAMEED, R. A. et al. Synthesis and antimicrobial activity of a new series of thiazolidine-2,4-diones carboxamide and amino acid derivatives. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 1–17. 2020

ALMEER, R. S. et al. Ziziphus spina-christi leaf extract ameliorates schistosomiasis liver granuloma, fibrosis, and oxidative stress through downregulation of fibrinogenic signaling in mice. **PloS one**, v. 13, n. 10, p. e0204923, 2018.

ALMEIDA JÚNIOR, A. S. A. et al. In vitro activity, ultrastructural studies and in silico pharmacokinetic properties of indol-3-yl-thiosemicarbazones derivatives and analogues against juvenile and adult worms of *S. mansoni*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 138, n. June, p. 104985, 2019

ÁLVAREZ-BARDÓN, M. et al. Screening marine natural products for new drug leads against trypanosomatids and malaria. **Marine Drugs**, v. 18, n. 4, p. 187, 2020.

AMARAL, A. T. et al. A evolução da química medicinal no brasil: avanços nos 40 anos da sociedade brasileira de química. *Química Nova*, v. 40, n. 6, p. 694 – 700. 2017.

AMORIM, C. R. et al. Schiff bases of 4-phenyl-2-aminothiazoles as hits to new antischistosomal: synthesis, in vitro, in vivo and in silico studies. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 150, p. 105371, 2020.

ANDRADE, F. H. D. et al. Solid-state characterization of the new antiparasitic drug 5-((5-bromo-1H-indol-3-yl)methylene)-3-(2,6-difluorobenzyl)thiazolidine-2,4-dione (GQ-238). **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**. v. 141, n. 4, p. 1379–1387. 2020

ARAÚJO NETO, L. N. et al. Thiophene-thiosemicarbazone derivative (L10) exerts antifungal activity mediated by oxidative stress and apoptosis in *C. albicans*. **Chemico-Biological Interactions**, v. 320, n. October 2019. 2020

AULA, O. P. et al. Schistosomiasis with a focus on Africa. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 6, n. 3, p. 109, 2021.

AZIZ, N. A. et al. Type 2 immunity: A two-edged sword in schistosomiasis immunopathology. **Trends in Immunology**, 2022.

BARBOSA, C. S. et al. Quality control of the slides by Kato-Katz method for the parasitological diagnosis of schistosomiasis infection by *Schistosoma mansoni*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 53, n. 2, p. 110–114, 2017

BARROS, C. D. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR $\gamma$  ligands. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**. v. 18, n. 11, p. 3805–3811, 2010

BECERRA, M. C. et al. In vitro activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruzi* epimastigote and trypomastigote forms. **Experimental Parasitology**. v. 131, p. 57-62, 2012

BERALDO, H. Semicarbazonas e Tiosemicarbazonas: o amplo perfil farmacológico e usos clínicos. **Química Nova**. v. 27, n. 3, p. 461–471, 2004

BRASIL, Ministério da Saúde. **Esquistossomose: causas, sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção**. Disponível em: <<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/esquistossomose>> Acesso em: 22 de julho de 2020.

BRITO, M. I. B. S.; SILVA, M. B. A.; QUININO, L. R. M. Situação epidemiológica e controle da esquistossomose em Pernambuco: estudo descritivo, 2010-2016. **Epidemiologia e serviços de Saúde: revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**. v. 29, n. 2, p. 1-11. 2020

CHAN, J. D. et al. The anthelmintic praziquantel is a human serotonergic G-protein-coupled receptor ligand. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–7. 2017

CHEEVER, A. W. Relative resistance of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 43, p. 601 – 603. 1970.

CORREIA DO NASCIMENTO, W. R. et al. Skin reactivity to aeroallergens in *Schistosoma mansoni*-Infected Brazilian individuals and modulation of CCL2 and IL-10. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**. v. 28, n. 6, p. 414–416. 2018

COSTAIN, A. H.; MACDONALD, A. S.; SMITS, H. H. Schistosome egg migration: mechanisms, pathogenesis and host immune responses. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 3042, 2018.

CZUBATKA-BIEN' KOWSKA, S. et al. Design, synthesis and biological evaluation of novel 4- thiazolidinones containing indolin-2-one moiety as potential antitumor agent. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 3509-3518, 2011.

CZUBATKA-BIEN'KOWSKA, A. et al. Thio-functionalized carbohydrate thiosemicarbazones and evaluation of their anticancer activity. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 27, n. 12, p. 2713–2720. 2017

DUBEUX, L. S. et al. Avaliação do Programa de Enfrentamento às Doenças Negligenciadas para o controle da esquistossomose mansônica em três municípios hiperendêmicos, Pernambuco, Brasil, 2014. **Epidemiologia e serviços de saúde : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**. v. 28, n. 2, p. e2018085. 2019

ESPÍNDOLA, J. W. P. et al. Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting Trypanosoma cruzi cruzain. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v. 101, p. 818–835, 2015

FDA, 2017. U.S. Food and Drug Administration. Recovered February. Disponível em <<https://www.fda.gov/AboutFDA/CentersOffices/OfficeofMedicalProductsandTobacco/CDER/ucm128219.html>> Acesso em: 14/08/2020

GIERA, M. et al. The Schistosoma mansoni lipidome: Leads for immunomodulation. **Analytica Chimica Acta**. v. 1037, p. 107–118. 2018

GUERRA, R. A. et al. In vitro and in vivo studies of spironolactone as an antischistosomal drug capable of clinical repurposing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 3, p. e01722-18, 2019.

HUSSEIN, M. A. et al. Asynthesis, Crystal Structures and in Vitro Anticancer Studies of New Thiosemicarbazone Derivatives. **Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements**. v. 190, n. 9, p. 1498-1508, 2015

JOSHI, P.; MAHAJAN, D.; CHEJARA, D. Facile synthesis and characterization of some new 5-arylidene-thiazolidine-2 , 4- diones and their antimicrobial evaluation. v. 59, n. May, p. 710–715. 2020

KALANTARI, P.; BUNNELL, S. C.; STADECKER, M. J. The C-type lectin receptor-driven, Th17 cell-mediated severe pathology in schistosomiasis: not all immune responses to helminth parasites are Th2 dominated. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 26, 2019.

KATZ, N. **Inquérito Nacional de Prevalência da Esquistossomose mansoni e Geohelmintoses**. [S.l.]: [s.n.], 2018.

KRYSHCHYSHYN, A. et al. Thiazolidinone/thiazole based hybrids – New class of antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2019. v. 174, p. 292–308. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.04.052>>.

LJUBIJANKIĆ, N. et al. Cytokinesis block micronucleus assay in human lymphocytes after exposure to Ru (III) thiosemicarbazone complexes in vitro. **RASAYAN Journal of Chemistry**, v. 11, n. 2, p. 647-652, 2018.

LLANWARNE, F.; HELMBY, H. Granuloma formation and tissue pathology in *Schistosoma japonicum* versus *Schistosoma mansoni* infections. **Parasite Immunology**, v. 43, n. 2, p. e12778, 2021

MATESANZ, A. I.; HERRERO, J. M.; QUIROGA, A. G. Chemical and Biological Evaluation of Thiosemicarbazone-Bearing Heterocyclic Metal Complexes. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 1, p. 59-72, 2021.

MATESANZ, A. I. et al. Mononuclear Pd (ii) and Pt (ii) complexes with an  $\alpha$ -N-heterocyclic thiosemicarbazone: cytotoxicity, solution behaviour and interaction versus proven models from biological media. **Inorganic Chemistry Frontiers**, v. 5, n. 1, p. 73-83, 2018.

MATOS-ROCHA, T. J. et al. In vivo effect of essential oil of *Mentha x villosa* and its active compound against *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907). **Brazilian Journal of Biology**, v. 6984. 2019

MCGARIGAL, K.; CUSHMAN, S. A.; STAFFORD, S. **Multivariate statistics for wildlife and ecology research**. Springer Science & Business Media, 2013.

MIKOVSKI, D. et al. Química Medicinal E A Sua Importância No Desenvolvimento De Novos Fármacos. **Revista Saúde e Desenvolvimento**, v. 12, n. n. 13, p. 29-43. 2018

MOREIRA, T. L. B. et al. Effect of thiazolidine LPSF SF29 on the growth and morphology of *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, p. 183-187, 2013.

NWEZE, J. A. et al. Potentials of marine natural products against malaria, leishmaniasis, and trypanosomiasis parasites: A review of recent articles. **Infectious Diseases of Poverty**, v. 10, n. 1, p. 1-19, 2021.

OLIVEIRA BARBOSA, M. et al. Schistosomicidal and prophylactic activities of phthalimido-thiazoles derivatives on schistosomula and adult worms. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 133, p. 15-27, 2019.

OLIVEIRA, C. N. F. et al. *Schistosoma mansoni*: in vivo evaluation of *Phyllanthus amarus* hexanic and ethanolic extracts. **Experimental Parasitology**, v. 183, p. 56-63, 2017.

OLIVEIRA, J. F. DE et. al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms

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

OLIVEIRA, S. A. et al. Phthalimido-thiazole as privileged scaffold: activity against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology Research**, p. 1-11, 2018

Organização das Nações Unidas – ONU. Agenda 2030. Disponível em: <<https://nacoesunidas.org/pos2015/agenda2030/2015/>>. Acesso em 23 de Julho de 2020.

OSAKUNOR, D. N.M; WOOLHOUSE, M.E.J; MUTAPI, F.. Paediatric schistosomiasis: What we know and what we need to know. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 2, p. e0006144, 2018.

PAIVA, R. K. C. DE et al. Synthesis, Antimicrobial Activity and Structure-Activity Relationship of Some 5-Arylidene-thiazolidine-2,4-dione Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 30, n. 1, p. 164–172. 2019

PARK, S. K. et al. The anthelmintic drug praziquantel activates a schistosome transient receptor potential channel. **Journal of Biological Chemistry**. v. 294, n. 49, p. 18873–18880. 2019

PATTAN, S. R. et al. Synthesis and evaluation of some 5-[1-{4-4-substituted phenyl amino}-meth-(Z)-ylidene]-thiazolidine-2, 4-dione for antitubercular activity. **Indian Drugs**, v. 45, p. 532-535, 2008.

PELLEGRINO, J. et al. New approach to the screening of drugs in experimental *Schistosoma mansoni* in mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 11. p. 201-215. 1962

PEREIRA MOREIRA, B. et al. Drug Repurposing and De Novo Drug Discovery of Protein Kinase Inhibitors as New Drugs against Schistosomiasis. **Molecules**, v. 27, n. 4, p. 1414, 2022.

PEREIRA, A. S. A. et al. In vitro activity of aryl-thiazole derivatives against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. **PLoS ONE**, v. 14, n. 11, p. 1–23, 2019.

PEREIRA, P. S. et al. Thiazolidinedione and thiazole derivatives potentiate norfloxacin activity against NorA efflux pump over expression in *Staphylococcus aureus* 1199B strains. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2019. v. 27, n. 17, p. 3797–3804.

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**, v. 34. p. 527-533. 2004

PRAJAPATI, N. P.; PATEL, H. D. Novel thiosemicarbazone derivatives and their metal complexes: Recent development. **Synthetic Communications**, v. 49, n. 21, p. 2767-2804, 2019.

QUEIROZ, C. M. et al. Thiosemicarbazone and thiazole: in vitro evaluation of leishmanicidal and ultrastructural activity on *Leishmania infantum*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 29, n. 11, p. 2050-2065, 2020.

RIBEIRO, A. G. et al. Novel 4-quinoline-thiosemicarbazone derivatives: Synthesis, antiproliferative activity, in vitro and in silico biomacromolecule interaction studies and topoisomerase inhibition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 182, 2019.

ROCHA, R. E. T. et al. Synthesis, in vitro schistosomicidal activity and ultrastructural alterations caused by thiosemicarbazones and thiazolidinones against juvenile and adult *Schistosoma mansoni* worms (Sambon, 1907). **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 252, p. 111520, 2022.

ROQUINI, D. B. et al. Promethazine exhibits antiparasitic properties in vitro and reduces worm burden, egg production, hepatomegaly, and splenomegaly in a schistosomiasis animal model. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 12, p. e01208-19, 2019.

SANTIAGO, E. F. et al. Evaluation of the anti-*Schistosoma mansoni* activity of thiosemicarbazones and thiazoles. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 1, p. 352–363, 2014.

SANTOS, S. S. et al. Searching for drugs for Chagas disease, leishmaniasis and schistosomiasis: a review. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 55, n. 4, p. 105906, 2020

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 31, p. 9 - 15, 1975.

SHAH, B.; MODI, P.; SAGAR, S. R. In silico studies on therapeutic agents for COVID-19: Drug repurposing approach. **Life Sciences**, v. 252, n. March, p. 117652. 2020

SHEN, J. et al. Nitric oxide blocks the development of the human parasite *Schistosoma japonicum*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 38, p. 10214-10219, 2017.

SHEPHERD, G. J. Fitopac 2.1. 2.85. Manual do Usuário. **Depto de Biologia Vegetal, Univ. Estadual de Campinas, Campinas, SP**, 2010.

- SIDDIQUI, E. J. et al. Thiosemicarbazone complexes as versatile medicinal chemistry agents: a review. **Journal of Drug Delivery and Therapeutics**, v. 9, n. 3, p. 689-703, 2019.
- SILVA FILHO, F. A. DA et al. Topoisomerase inhibition and albumin interaction studies of acridine-thiosemicarbazone derivatives. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 138, p. 582–589. 2019
- SILVA, A. C. et al. Aryl thiosemicarbazones: In vitro and immunomodulatory activities against *L. amazonensis*. **Experimental parasitology**, v. 177, p. 57-65, 2017.
- SILVA, A. L. In vivo study of schistosomicidal action of 1-benzyl-4-[(4-fluoro-phenyl)-hydrazono]-5-thioxo-imidazolidin-2-one. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 83, p. 502-507, 2016.
- SILVA, G. B. et al. Schistosomiasis-associated kidney disease: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 1, p. 79–84, 2013.
- SILVA, V. B. R. et al. Medicinal chemistry of antischistosomal drugs: Praziquantel and oxamniquine. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 3259–3277, 2017.
- SINGH, M. et al. Design, synthesis and mode of action of novel 2-(4-aminophenyl) benzothiazole derivatives bearing semicarbazone and thiosemicarbazone moiety as potent antimicrobial agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 25, n. 2, p. 263-282, 2016.
- SIQUEIRA, L. R. P. DE et al. Multi-target compounds acting in cancer progression: Focus on thiosemicarbazone, thiazole and thiazolidinone analogues. **European Journal of Medicinal Chemistry**, 2019. v. 170, p. 237–260.
- SUBHASHREE, G. R. et al. In vitro antioxidant, antiinflammatory and in silico molecular docking studies of thiosemicarbazones. **Journal of Molecular Structure**, v. 1145, p. 160–169, 2017.
- SWATHI, N.; RAMU, Y.; SATYANARAYANA, K. **Academic Sciences**.v.4,p.2–7, 2012.
- SZYCHOWSKI, K. A. *et al.* Study of novel anticancer 4-thiazolidinone derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, v. 262, p. 46–56. 2017
- TOMASIC, T. et al. Novel 2-thioxothiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase targeting D-Glu- and diphosphate-binding sites. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 3964-3975, 2011.
- VALE, N. et al. Praziquantel for Schistosomiasis: SingleDrug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 61, n. 5, p. 1-16. 2017

WHO. World Health Organization. Schistosomiasis. Disponível em: <[https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/schistosomiasis#tab=tab_1)>. Acesso em 27 de Julho de 2020.

ZANI, C. et al. A battery of assays as an integrated approach to evaluate fungal and mycotoxin inhibition properties and cytotoxic/genotoxic side-effects for the prioritization in the screening of thiosemicarbazone derivatives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 105, p. 498-505, 2017.

ZHANG, C. et al. In vitro and in vivo anti-inflammatory effects of polyphyllin VII through downregulating MAPK and NF- $\kappa$ B pathways. **Molecules**, v. 24, n. 5, p. 875, 2019.

## ANEXOS

## ANEXO 1 – Comitê de Ética em Uso de Animais



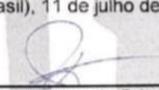
## COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA in vivo DE NOVOS COMPOSTOS SINTÉTICOS FRENTE AO *Schistosoma mansoni*" protocolado sob nº 142/2019 pelo (a) pesquisador (a) **Luiz Carlos Alves** está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 11 de julho de 2023 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais serão advindos do Biotério de criação do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE. É responsabilidade do coordenador do projeto notificar à CEUA de quaisquer alterações em relação ao projeto. O coordenador concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo heterogênico Swiss Webster	335 (30 gr / 30 dias / Macho ou fêmea)
Camundongo heterogênico Swiss Webster	400 (30 gr / 30 dias / Macho)
<b>Total</b>	<b>735</b>

Recife (PE, Brasil), 11 de julho de 2019

  
 M<sup>h</sup> Edileuza Felinto de Brito  
 Vice Coordenadora CEUA/IAM  
 Maria Edileuza Felinto de Brito  
 Vice-Coordenadora do Comitê de Ética no  
 Uso de Animais do IAM/Fiocruz-PE  
 Mat. Sape 0464761  
 E-mail: britomef@cpqam.fiocruz.br

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