



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE - PPGBAS

RUBENS EMANOEL TAVARES DA ROCHA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE
TIOSEMICARBAZONAS E TIAZOLIDINAS FRENTE AO *Schistosoma mansoni*
(Sambon, 1907)**

RECIFE

2018

RUBENS EMANOEL TAVARES DA ROCHA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE
TIOSEMICARBAZONAS E TIAZOLIDINAS FRENTE AO *Schistosoma mansoni*
(Sambon, 1907)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof^o. Dr. Luiz Carlos Alves

Co-orientador: Prof^o. Dr. Fábio André Brayner dos Santos

RECIFE

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Rocha, Rubens Emanuel Tavares da

Avaliação da atividade esquistossomicida de tiossemicarbazonas e tiazolidinas frente ao *Schistosoma mansoni* (Sambon, 1907) / Rubens Emanuel Tavares da Rocha. – 2018.

60 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Alves.

Coorientador: Prof. Dr. Fábio André Brayner dos Santos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2018.

Inclui referências e anexos.

1. Doenças parasitárias. 2. Esquistossomose. 3. *Schistosoma mansoni*. 4. Farmacologia. I. Alves, Luiz Carlos (Orientador) II. Santos, Fábio André Brayner dos (Coorientador) III. Título.

616.963

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 415

RUBENS EMANOEL TAVARES DA ROCHA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE
TIOSEMICARBAZONAS E TIAZOLIDINAS FRENTE AO *Schistosoma mansoni*
(Sambon, 1907)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 30/07/2018

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Carlos Alves (Orientador)
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

Prof. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Prof. Dra. Ana Paula Sampaio Feitosa (Examinadora Interna)
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE

Dedico este trabalho as minhas avós, Eronilda Correia de Mendonça (*in memorian*) e Maria José Galdino de Rocha (*in memorian*), por sempre acreditarem que um dia chegaria onde estou.

Amo vocês infinitamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me conceder chegar a mais esta etapa da minha vida.

Aos meus pais, Marcos Rocha e Rosimar Mendonça, pelo suporte em todas as etapas de minha vida, meu amor por vocês é incondicional.

As minhas irmãs, Eveline Rocha e Emmanuelle Tavares, por serem tão presentes em todas as vitórias que alcançamos.

Ao meu orientador, Dr. Luiz Carlos Alves e o meu co-orientador, Dr. Fábio Brayner pela receptividade no grupo, pela oportunidade e por toda a paciência nestes dois anos de trabalho.

Ao Prof. Dr. Antônio Sérgio pela amizade e paciência desde a estruturação do meu projeto até a finalização desta dissertação. **MUITO OBRIGADO!**

As minhas amigas Amanda Vasconcelos e Karla Ribeiro, pela ajuda na escrita do projeto e nos ensaios de citotoxicidade.

Aos meus companheiros do Laboratório de Biologia Celular e Molecular – LBCM, Jorge Belém, Gabriel Gazzoni, Fernanda Lima, Elverson Melo, Sophia Dantas, Everton Morais, Catarina Fernandes, Alberon Ribeiro, Elda Souza, Victor Emanuel, Walter Ebberts II, Dayviane Mota e Iany França, pelo suporte diário, por toda a ajuda nos momentos difíceis, pelas inúmeras gordices e por compartilhar todos os êxitos. **VOCÊS SÃO INCRÍVEIS!**

Aos meus companheiros do #ShistoTeam, em especial ao meu amigo Nairomberg Portela por sempre estar ao meu lado nos experimentos e em todas as nossas árduas tarefas diárias.

Aos queridos Gabriel Gazzoni, Jana Sandes e Rafael Padilha do Laboratório de Microscopia Eletrônica do LIKA pelo suporte na execução deste projeto.

A Prof. Dra. Maria do Carmos Alves de Lima e toda a equipe do Laboratório de Química e Inovação Terapêutica – LqIT da Universidade Federal de Pernambuco pela síntese e concessão das moléculas para o meu estudo.

Ao Prof. Dr. Jamerson Oliveira por todo o suporte na parte química deste projeto.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA e ao Instituto Aggeu Magalhães, por toda a estrutura para os experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, em especial a Fábio Costa por todo o suporte e pela paciência em todas as nossas demandas.

As Prof. Dra. Maria do Carmo Alves de Lima, Prof. Dra. Ana Paula Sampaio Feitosa e Prof. Dr. Antônio Sérgio Alves de Almeida Júnior pelas considerações feitas a este trabalho.

Aos Biotérios do LIKA e do IAM por todos os materiais necessários para a execução deste projeto.

A Capes pela concessão da bolsa.

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 cerca de 258 milhões de pessoas mundialmente e matam 500 mil por ano. Causada pelo helminto *Schistosoma mansoni*, no Brasil está presente em 19 estados e no Distrito Federal. O tratamento preconizado pela OMS é feito exclusivamente com o praziquantel, apesar da grande problemática pela sua baixa eficácia em fases juvenis dos parasitas e efeitos adversos nos pacientes. As tiossemicarbazonas e tiazolidinas são grupos químicos que já apresentam grande espectro de atividade biológica, e com modificações nos radicais, podem se tornar mais eficazes e mais seletivas aos alvos biológicos. Várias séries dos grupos químicos tiossemicarbazonas e tiazolidinas vem sendo desenvolvidos e testados. Para avaliar a ação destas moléculas frente ao *Schistosoma mansoni*, compostos da série JF-LqIT/UFPE foram sintetizados: JF30, JF31, JF33, JF34, JF35, JF36, JF38, JF39, JF42 e JF43. Foram avaliados a citotoxicidade em células VERO, atividade esquistossomicida *in vitro* para vermes jovens e adultos e alterações ultraestruturais. O composto JF35 apresentou CC₅₀ de 724,13µM, sendo menos citotóxicos que o PZQ que teve como índice 658,30µM. Os compostos JF39 e JF42 apresentaram índices de 622,27µM e 609,83µM, respectivamente. Os compostos JF30, JF31, JF33, JF34, JF36, JF38 e JF43 foram mais citotóxicos que o controle positivo. Os compostos JF31 e JF43, apresentaram 100% de mortalidade em 24h na dose de 200µM para vermes adultos e 48h para jovens. Foram avaliados parâmetros de motilidade, mortalidade e oviposição: JF31 e JF43 apresentaram *score* 0 em 24h, significando ausência total de movimentos, não apresentaram ovos e danos tegumentares foram observados em microscopia ótica. Através de microscopia eletrônica de varredura tais alterações tegumentares foram observados danos estruturais causados pelos compostos JF31 e JF43, como: exposição da musculatura, formação de bolhas tegumentares, tegumentos com morfologia anormal e destruição de tubérculos e espículas. O composto JF31 apresentou-se 1,20 vezes mais seletivo para vermes jovens e 2,39 vezes para vermes adultos; o composto JF43 foi 3,74 vezes mais seletivo para vermes jovens e 1,87 para vermes adultos. Assim, os compostos JF31 e JF43, demonstraram-se os mais promissores por apresentarem atividade esquistossomicida frente ao *S. mansoni* em diferentes fases de desenvolvimento.

Palavras-chave: Tiossemicarbazonas. Tiazolidinas. *Schistosoma mansoni*. Atividade Biológica

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected disease that affects about 258 million people worldwide and kills 500,000 a year. Caused by the helminth *Schistosoma mansoni*, in Brazil it is present in 19 states and in the Federal District. The treatment recommended by the WHO is done exclusively with praziquantel, despite the great problem due to its low effectiveness in juvenile phases of the parasites and adverse effects in the patients. Thiosemicarbazones and thiazolidines are chemical groups that already have a large spectrum of biological activity, and with modifications in the radicals, can become more effective and more selective to biological targets. Several series of the chemical groups thiosemicarbazones and thiazolidines have been developed and tested. To evaluate the action of these molecules against *Schistosoma mansoni*, JF-LqIT/UFPE series compounds were synthesized: JF30, JF31, JF33, JF34, JF35, JF36, JF38, JF39, JF42 and JF43. Cytotoxicity was evaluated in VERO cells, *in vitro* schistosomicidal activity for young and adult worms and ultrastructural alterations. Compound JF35 had CC_{50} of 724.13 μ M, being less cytotoxic than PZQ, which had a 658.30 μ M index. The compounds JF39 and JF42 presented indices of 622.27 μ M and 609.83 μ M, respectively. Compounds JF30, JF31, JF33, JF34, JF36, JF38 and JF43 were more cytotoxic than the positive control. Compounds JF31 and JF43, presented 100% mortality in 24 hours at the dose of 200 μ M for adult worms and 48h for young. Motility, mortality and oviposition parameters were evaluated: JF31 and JF43 presented a score 0 in 24h, meaning total absence of movements, no eggs and tegumentary damages were observed under optical microscopy. Through scanning electron microscopy, such tegumentary changes were observed structural damage caused by compounds JF31 and JF43, such as exposure of the musculature, formation of tegumentary blisters, teguments with abnormal morphology and destruction of tubers and spicules. Compound JF31 was 1.20 times more selective for young worms and 2.39 times for adult worms; the compound JF43 was 3.74 times more selective for young worms and 1.87 for adult worms. Thus, compounds JF31 and JF43 have been shown to be the most promising because they present schistosomicidal activity against *S. mansoni* at different stages of development.

Keywords: Thiosemicarbazones. Thiazolidines. *Schistosoma mansoni*. Biological Activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Revisão da Literatura

Figura 01 -	Índices de positividade da esquistossomose no Brasil	14
Figura 02 -	Microscopia eletrônica de varredura de <i>S. mansoni</i> , mostrando a fêmea presente no verme no canal ginecóforo do macho	17
Figura 03 -	Ciclo biológico do <i>Schistosoma mansoni</i>	18
Figura 04 -	Criança com formas hepatoesplênicas	19
Figura 05 -	Fórmula estrutural da oxaminiquine	21
Figura 06 -	Fórmula estrutural do Praziquantel	22
Figura 07 -	Estrutura básica de uma tiossemicarbazonas	23
Figura 08 -	Anél tiazolidinico	24

Artigo 1

Figura 01 -	Microscopia Eletrônica de Varredura – Vermes jovens do grupo controle negativo	43
Figura 02 -	Microscopia Eletrônica de Varredura – Vermes jovens do grupo controle positivo – PZQ	44
Figura 03 -	Microscopia Eletrônica de Varredura – Vermes jovens tratados com JF31 200µM por 48h	45
Figura 04 -	Microscopia Eletrônica de Varredura – Vermes jovens tratados com JF43 100µM por 48h	46
Figura 05 -	Microscopia Eletrônica de Varredura – Vermes adultos do grupo controle negativo	47
Figura 06 -	Microscopia Eletrônica de Varredura – Vermes adultos do grupo controle positivo	48
Figura 07 -	Microscopia Eletrônica de Varredura – Vermes adultos tratados com JF31 200µM por 24h	49
Figura 08 -	Microscopia Eletrônica de Varredura – Vermes adultos tratados com JF43 200µM por 24h	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LqIT	Laboratório de Química e Inovação Terapêutica
PZQ	Praziquantel
OMS	Organização Mundial de Saúde
FDA	Food and Drug Administration
OXA	Oxaminiquine
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
CEUA	Comitê de Ética em Uso de Animais
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
DMSO	Dimetilsulfóxido
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
CO ₂	Dióxido de Carbono
IAM	Instituto Aggeu Magalhães
et al.	e outro
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	OBJETIVOS.....	13
1.1.1	Objetivo Geral	13
1.1.2	Objetivos Específicos	13
2	REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1	A ESQUISTOSSOMOSE	14
2.2	AGENTE ETIOLÓGICO	15
2.2.1	Ovo	15
2.2.2	Miracídio	15
2.2.3	Esporocisto	15
2.2.4	Cercarias	16
2.2.5	Esquistossômulo	16
2.2.6	Vermes jovens e adultos	16
2.3	CICLO DE VIDA	17
2.4	SINTOMATOLOGIA E CLÍNICA DA ESQUISTOSSOMOSE	19
2.5	TRATAMENTOS	20
2.5.1	A Oxaminiquine (OXA)	20
2.5.2	O Praziquantel (PZQ)	21
2.6	TIOSSEMICARBAZONAS.....	23
2.7	TIAZOLIDINAS	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1	ANIMAIS EXPERIMENTAIS	25
3.2	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZONAS E TIAZOLIDINAS	25
3.3	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE <i>in vitro</i>	27
3.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA <i>in vitro</i> EM VERMES JOVENS E ADULTOS DE <i>S. mansoni</i>	28
3.5	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	28
4	RESULTADOS	29
4.1	ARTIGO 1 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ESQUISTOSSOMICIDA E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE TIOSSEMICARBAZONAS E TIAZOLIDINAS FRENTE À VERMES JOVENS E ADULTOS DE <i>S.</i> <i>mansoni</i>	29
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	56
	REFERÊNCIAS	57
	ANEXO A – PARECER DO CEUA	60

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença negligenciada, causadora de grandes índices de morbidade e mortalidade na população mundial (MATOS-ROCHA et al., 2016), principalmente as que vivem em regiões tropicais e subtropicais, que não desfrutam de condições adequadas de acesso à água potável, sistema de esgotamento sanitário e de acesso precário aos sistemas educacionais (WHO, 2014).

No Brasil, estima-se que a parasitose ocorra em 19 dos 26 estados e no Distrito Federal, tendo a região Sudeste como detentora dos maiores índices, com destaque ao estado de Minas Gerais (ESPIRITO-SANTO et al., 2015). No estado de Pernambuco, a esquistossomose é uma doença prevalentemente das áreas rurais, contudo, estudos de Barbosa et al. (2017) demonstram que o litoral já apresenta altos índices de transmissão.

Um dos maiores desafios para o enfrentamento da esquistossomose é o tratamento. No Brasil, desde a década de 60, o Ministério da Saúde dispunha de dois medicamentos: a oxaminiquine e o praziquantel. Através de estudos clínicos, a oxaminiquine foi retirada da grade do Ministério da Saúde na década de 80, tornando o praziquantel (PZQ) a droga de primeira escolha para o tratamento da esquistossomose (CIOLI et al., 2014).

O praziquantel é eficaz para todas as espécies de *Schistosoma*, contudo, a grande quantidade de efeitos adversos (tonturas, náuseas, sensações de desmaios, gosto de ferro na boca do paciente), somando a isto a falta de uma formulação pediátrica, fazem com que muitos pacientes abandonem o tratamento (SILVA et al., 2017). Atrelado a estes fatores, a literatura já demonstra cepas refratárias à ação do medicamento, além da sua pouca ação em formas jovens, tornando assim necessário que outras moléculas e fármacos sejam avaliados a fim de que sejam utilizados em pacientes também esquistossomóticos (MATOS-ROCHA et al., 2016).

Nessa perspectiva, a busca de novos compostos com amplo espectro de atividade biológica é um dos desafios para os estudiosos da química medicinal. As tiossemicarbazonas e as tiazolidinas são descritos na literatura por apresentar ação anticâncer (Oliveira et al., 2017), anti-tripanosomatídea (Espíndola et al., 2015), anti-leucemia (Graser-Loescher et al., 2017). Contudo, as modificações estruturais possíveis em tais compostos possibilitam que os mesmos sejam mais seletivos aos alvos biológicos, com menor toxicidade e maior eficácia.

A série JF-LqIT/UFPE é composta por tiossemicarbazonas e tiazolidinas análogas, com a presença de radicais já descritos na literatura com ação antioxidante e anti-inflamatória, tornando-as como potenciais agentes esquistossomicidas.

Baseando-se no princípio que o Brasil é um país acometido com um alto número de parasitoses, e que elas se apresentam como um grave problema de saúde pública pela sua relevância clínica e epidemiológica, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos é uma prioridade. Tendo em vista que no Brasil utiliza-se apenas o praziquantel para o tratamento desde a década de 60, onde, este causa efeitos colaterais e possui baixa eficácia na fase jovem do parasita, o desenvolvimento de novos compostos tem permitido o aprimoramento da estrutura de novas moléculas de tiossemicarbazonas e tiazolidinas para que atuem com maior seletividade a agentes patogênicos, sem causar danos ao hospedeiro. Desta forma, este trabalho objetiva avaliar a atividade biológica da série JF/LqIT – UFPE, frente ao *S. mansoni*, em suas fases juvenis e adulta, através de testes *in vitro*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial esquistossomicida das tiossemicarbazonas e tiazolidinas (Série JF/LqIT - UFPE) frente ao *Schistosoma mansoni*.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o potencial citotóxico dos compostos em linhagem de células VERO;
- Verificar a atividade esquistossomicida *in vitro* dos compostos sobre vermes jovens e adultos de *S. mansoni*;
- Verificar os efeitos ultraestruturais causados pelas tiossemicarbazonas e tiazolidinas no *S. mansoni*.

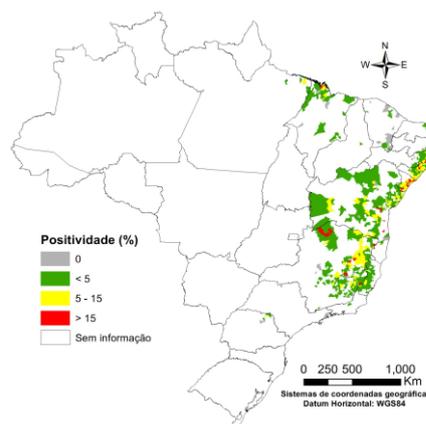
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma doença infecciosa que está incluída na lista de Doenças Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e apresenta um significativo impacto econômico e também social, tendo em vista que 779 milhões de pessoas estão em eminente risco de infecção, levando a número de óbitos na casa de 500.000 anualmente. (COLLEY et al., 2014; AIRES et al., 2014).

No Brasil, a esquistossomose está presente em 19 dos 26 Estados da Federação (Fig.1), e estima-se que 25 milhões de pessoas estão em risco de contaminação, atrelados a 6 milhões de pessoas já infectadas (ESPIRITO-SANTO et al., 2015). O índice de positividade do Brasil, segundo Espirito-Santo et al. (2015), é de 6,94%, variando entre 0,04% como no estado do Piauí, até 11,88% no estado de Pernambuco. Contudo, segundo dados do Programa de Controle da Esquistossomose (PCE) do Ministério da Saúde, os índices no Estado de Pernambuco no ano de 2016, variaram entre 0,08% na cidade de Agrestina e 20,1% na cidade de Maraial.

Figura 1 - Índices de positividade da esquistossomose no Brasil



Fonte: Ministério da Saúde

Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/png/2017/setembro/14/mapa-distribuicao-esquistossomose-2010-1015.png>. Acesso em 09/07/2018

2.2 AGENTE ETIOLÓGICO

O agente etiológico da esquistossomose é um platelminto (verme com o corpo caracteristicamente achatado), pertencente à classe dos trematódeos, família *Schistosomatidae*, com presença de sexos separados e dimorfismo sexual. (BRASIL, 2014). Existem três espécies de *Schistosoma* que infectam os seres humanos: *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma mansoni* e elas afetam regiões específicas do planeta, tais quais África, Ásia e Américas, respectivamente (COLLEY et al., 2014). O principal agente etiológico para a esquistossomose intestinal é o *Schistosoma mansoni*, onde estima-se que 258 milhões de pessoas estão infectadas pelo mesmo (MATOS-ROCHA et al., 2017). Em cada etapa do ciclo evolutivo do parasito, diferenças morfológicas podem ser observadas para caracterizar o agente etiológico.

2.2.1 Ovo

Os ovos de *S. mansoni* são importantes dentro do ciclo de vida do parasito, uma vez que eles são chaves para a continuidade ou não do ciclo desse parasito. São morfológicamente grandes, medindo cerca de 150 micrômetros, e apresentam uma espícula lateral (NEVES, 2003).

2.2.2 Miracídio

O miracídio é uma fase larval do *S. mansoni*, que se caracteriza morfológicamente por ter toda a sua superfície recoberta por cílios, facilitando o seu processo de natação em busca dos caramujos do gênero *Biomphalaria*, hospedeiro intermediários da esquistossomose mansônica (NEVES, 2003).

2.2.3 Esporocisto

Após a penetração dos miracídios nas partes moles dos caramujos, a sua estrutura externa perde-se, fazendo com que as células germinativas entrem em processo de remodelação e reestruturação, onde em cerca de 6 a 8 dias começam o processo de multiplicação, onde ao final de 4 a 6 semanas, serão liberadas as formas de cercarias (NEVES, 2003).

2.2.4 Cercarias

As cercarias são os elos principais entre o hospedeiro intermediário e o hospedeiro definitivo, definindo assim o rumo do parasita e, conseqüentemente, o do paciente (NEVES, 2003). Apresentando comprimento total de cerca de 500 μ M, tem como uma das principais características morfológicas a cauda bifurcada e duas ventosas: oral e ventral. A ventosa ventral é a estrutura que primordialmente fixa-se a pele do hospedeiro e leva ao processo de penetração (NEVES, 2011).

2.2.5 Esquistossômulo

Três dias após a penetração da cercaria, os esquistossômulos são levados aos pulmões, a fim de que consigam acessar a pequena circulação para que possam chegar as veias do sistema porta hepático para a maturação dos vermes juvenis em adultos (NEVES, 2011).

2.2.6 Vermes jovens e adultos

Ao chegarem no sistema porta-hepático, os vermes ainda imaturos irão passar por um processo de amadurecimento até alcançar a maturidade e conseqüentemente a capacidade de formação de casais a fim de que haja o processo de reprodução sexuada (NEVES, 2003).

O parasito tem como principal local para desenvolvimento e cópula as vênulas tributárias do sistema porta, em especial das veias mesentéricas superiores do plexo hemorroidário e mesmo da porção intra-hepática da veia porta. No interior desses vasos, macho e a fêmea (Fig. 2) acasalam e liberam ovos (BRASIL, 2014).

O macho mede entre 6,5 mm e 12 mm de comprimento e é achatado, porém, devido ao enrolamento ventral de suas bordas corporais para formação do canal ginecóforo, adquire um aspecto cilíndrico (BRASIL, 2014). Ao longo do desenvolvimento do macho, várias são as suas características: aos 30 dias de infecção, os vermes jovens já apresentam tubérculos tegumentares, porém sem a presença de espículas. Ao decorrer dos dias, as espículas serão formadas a fim de que haja proteção do macho (MATOS-ROCHA et al., 2016) e conseqüentemente da fêmea presente em seu canal para que haja a cópula e liberação de ovos.

A fêmea, caracteristicamente mais fina que o macho, tem um comprimento maior (cerca de 15 mm), apresenta uma coloração mais escura e é perfeitamente cilíndrica, com as extremidades afiladas e papilas sensoriais distribuídas pelo ao longo de seu liso tegumento. Uma vez instalada no canal ginecóforo do macho, é facilmente fecundada e inicia a postura dos ovos no interior das vênulas da submucosa intestinal. (BRASIL, 2014).

Figura 02. Microscopia eletrônica de varredura de *S. mansoni*, mostrando a fêmea presente no verme no canal ginecóforo do macho.



Fonte: http://scienceblogs.com.br/rainha/files/2011/08/schistosoma_mansonil.jpg

2.3 CICLO DE VIDA

O ciclo biológico (Fig. 03), segundo Katz et al. (2003) inicia-se com a postura dos ovos que ocorre nos vasos capilares do intestino do hospedeiro, quando então passam para a luz intestinal e são eliminados juntos com as fezes. Quando maduros, os ovos do *S. mansoni* medem 150 µm de comprimento por 65 µm de largura. A presença de uma espícula lateral facilita a sua identificação. Ao entrar em contato com a água, as larvas ciliadas denominadas miracídios eclodem. O miracídio é o primeiro estágio de vida livre do *Schistosoma*. De formato oval e revestido por numerosos cílios, mede em torno de 150 a 170µm de comprimento e de 60 a 70µm de largura. Onde não há rede de esgotos e as fezes infectadas são lançadas indevidamente em rios e lagos, os miracídios têm a chance de nadar ao encontro do hospedeiro intermediário, o caramujo, dando continuidade ao ciclo evolutivo do parasito e, conseqüentemente, possibilitando a transmissão da parasitose ao homem.

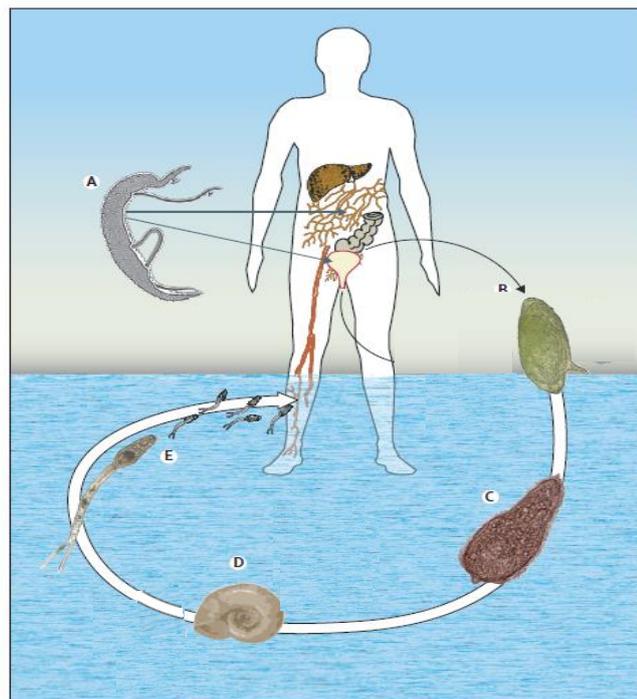
Ao penetrar nas partes moles do molusco, o miracídio perde parte de suas estruturas. As células remanescentes se reorganizam e, em 48 horas, transformam-se em um saco alongado repleto de células germinativas. Esse saco é denominado esporocisto. Os esporocistos primários geram os secundários ou esporocistos filhos e as células germinativas, desse último, são transformadas em cercarias. A cercaria representa a segunda fase de vida livre do parasito. Ela passa pela parede do esporocisto e migra para as partes moles externas do caramujo. É uma larva com corpo e cauda, adaptada à vida aquática. O corpo mede 0,2

mm de comprimento por 0,07 mm de largura e a cauda, aproximadamente 300 mm. Na pele do homem, a penetração é consumada pela ação lítica e pela ação mecânica devido aos movimentos intensos da larva (Katz et al., 2003).

A partir de 27 dias da penetração das cercarias, após a migração dos esquistossomos para as veias mesentéricas, inicia-se, geralmente, o acasalamento. Os vermes adultos se localizam na veia portal e nos ramos terminais das veias mesentéricas, migram para as vênulas da submucosa intestinal, onde se darão as posturas dos ovos, por meio de uma série de contrações musculares (Katz et al., 2003).

A migração dos ovos do vaso para a luz intestinal provoca micro-hemorragias e áreas de inflamação responsáveis pelo aparecimento de diarreia muco sanguinolenta e de outros distúrbios gastrointestinais (BRASIL, 2014).

Figura 03. Ciclo biológico do *Schistosoma mansoni*.



(A) Vermes adultos de *S. mansoni*; (B) Ovos de *S. mansoni* com a espícula lateral característica; (C) Miracídeo – 1º estágio de vida livre; (D) Caramujos do gênero *Biomphalaria* – hospedeiro intermediário para a esquistossomose mansônica; (E) Cercarias – Forma infectante ao hospedeiro definitivo.

Fonte: Adaptado de Colley et al. (2014)

2.4 SINTOMATOLOGIA E CLÍNICA DA ESQUISTOSSOMOSE

A evolução da doença pode ocorrer de forma assintomática, sendo um dos grandes problemas no enfrentamento da mesma (BRASIL, 2014). A patogênese é iniciada com a reação inflamatória granulamentosa do organismo aos ovos de *S. mansoni* depositados no fígado e/ou outros tecidos do hospedeiro (SANTIAGO et al., 2015).

Os sintomas variam de acordo com a progressão da enfermidade. Segundo Vale et al. (2017), podemos definir alguns sintomas clássicos de acordo com o estágio da patogenia, nos primeiros momentos, erupções dérmicas nos locais em que houveram penetração de cercarias, conhecida popularmente como dermatite do nadador; na fase aguda, destaca-se febre, fadiga, mialgia, mal-estar, tosse, eosinofilia, infiltrados irregulares, perda de peso, dispneia, diarreia, dor, toxemia, hepatoesplenomegalia e erupção cutânea generalizada; já na fase crônica, temos o comprometimento do trato gastrointestinal levando a hepatoesplenomegalia (Fig. 04) e doenças dos órgãos pélvicos, hipertensão portal e pulmonar, ascite, varizes gastrointestinais altas e hemorragia.

Figura 04. Criança com formas hepatoesplênicas.



Fonte:

http://mundoeducacao.bol.uol.com.br/upload/conteudo_legenda/3c2952cbbf48c962853ad595538aacc0.jpg

2.5 TRATAMENTOS

Os tratamentos para esquistossomose com medicamentosos demonstraram-se sempre limitados pela dificuldade de se obter agentes quimioterápicos que sejam simultaneamente eficazes e tolerantes.

A esquistossomose é uma doença com números expressivos de mortalidade, morbidade e risco de infecção, fazendo com que o tratamento desta parasitose se torna fundamental para a mudança de tais parâmetros. A correlação existe entre o tratamento da esquistossomose e o praziquantel (PZQ) é imediata. Esta ligação deve-se ao fato do PZQ ser o único fármaco em utilização no Brasil (CIOLI et al., 2014). Nos países acometidos pela esquistossomose, ciclos repetidos de tratamentos de PZQ, conhecidos como tratamento em massa, são empregados na população na tentativa de controlar a disseminação e reinfecção da população naquela área (SILVA et al., 2017).

Desde o tártaro de antimônio, vários foram as quimioterapias empregadas para o tratamento da esquistossomose, dentre elas, destaca-se a oxaminiquine, medicamento utilizado no Brasil e retirado de uso pelo Ministério da Saúde na década de 60.

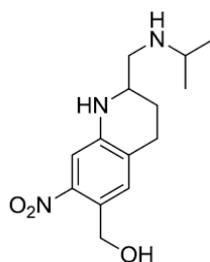
2.5.1 A Oxaminiquine (OXA)

Atualmente conhecida pela sua grande utilização num passado recente, a oxaminiquine foi usada por muito tempo antes da introdução do PZQ, para tratar muitos milhões de pessoas infectados com *S. mansoni* (CIOLI et al., 2014). Apresentando-se como um medicamento esquistossomicida de baixo custo e grande efetividade, principalmente ao parasito macho (SILVA et al., 2017), a OXA não foi utilizada fora das Américas pela sua baixa eficácia em outras espécies de Schistosoma.

A OXA tem a sua fórmula química descrita como (\pm) -(7-nitro-2-[(propan-2-yl) amino]methyl)-1,2,3,4-tetrahydroquinolin-6-yl)metanol (Fig. 05) e foi desenvolvido pelo grupo Pfizer, na Inglaterra (SILVA et al., 2017). Comparada ao PZQ, a OXA apresenta ainda mais baixo custo e a sua dose é mais baixa (entre 15 e 20 mg/Kg) (OMS, 1990). Contudo, pela sua grande quantidade de efeitos adversos, a oxaminiquine foi retirada de utilização no Brasil, sendo ainda utilizada em países da África (CIOLI et al., 2014).

Com a retirada da oxaminiquine, o PZQ tornou-se no Brasil o fármaco de primeira escolha para o tratamento da esquistossomose (SILVA et al., 2017).

Figura 05. Fórmula estrutural da oxaminiquine.



Fonte: SILVA *et al.* (2017)

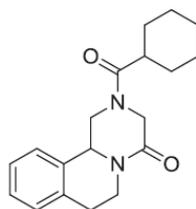
2.5.2 O Praziquantel (PZQ)

O PZQ é o fármaco de primeira escolha pela Organização Mundial de Saúde para o tratamento de indivíduos com esquistossomose, por apresentar atividade contra *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. matthei* (ARAÚJO *et al.*, 2010). Contudo, as reações adversas acontecem em números significativos de usuários, tais quais náuseas, vômitos, desconforto abdominal, anorexia e diarreia; outros usuários também relatam cefaleias, tonturas e sonolência e em alguns casos, erupções cutâneas e urticárias, associadas a um quadro de febre e fadiga (SILVA *et al.*, 2017).

Outro grande problema é o relato do aparecimento de cepas refratárias ao tratamento com PZQ. Estudos publicados por Fallon *et al.* (1996), já demonstravam tais preocupações, quando ao infectarem ratos com quatro cepas distintas circulantes no país e administrarem 07 (sete) ciclos de tratamento com o PZQ em doses de 300 mg/kg, houve uma taxa de sobrevivência de 93% dos parasitos adultos. Até o momento, não houve relato de aparecimento de cepas refratárias a esse medicamento em áreas endêmicas no Brasil. Todavia, recomenda-se que seja dada especial atenção aos pacientes que tenham sido tratados várias vezes e não tenham se curado (BRASIL, 2014). Estudos de Matos-Rocha *et al.* (2016), mostram que o PZQ não é tão eficiente nas formas mais jovens do *S. mansoni*, gerando assim uma necessidade que outras substâncias sejam estudadas, a fim de que não haja necessidade um retardo no tratamento.

O PZQ tem a sua fórmula química conhecida como (\pm)-2-cyclohexanecarbonyl 1H,2H,3H,4H,6H,7H,11bH-piperazino[2,1-a]isoquinolin-4-one, (SILVA *et al.*, 2017) (Fig. 06). Seu uso teve início em 1996 e é atualmente o único medicamento utilizado no tratamento (BRASIL, 2014).

Figura 06. Fórmula estrutural do Praziquantel.



Fonte: SILVA *et al.* (2017)

Seu mecanismo de ação baseia-se na desregulação das bombas de sódio-potássio das células presentes no tegumento do *S. mansoni*, que é uma estrutura importante para a sua sobrevivência uma vez que está envolvida em vários processos vitais, tais quais: na absorção de nutrientes, secreção de metabólitos, equilíbrio osmótico e defesa contra parasitas do sistema imune do hospedeiro (MATOS-ROCHA *et al.*, 2016).

O PZQ não é utilizado exclusivamente no tratamento da esquistossomose, por isso a apresentação comercial pode variar: Biltricide[®] é a denominação mais comum no mercado para o tratamento da esquistossomose. Nela, os comprimidos se apresentam com concentração de 600mg, diferente do Cestox[®], prescrito em casos de infestações por tênias (*T. solium* e *T. saginata*), e que se apresenta na forma de comprimidos cuja concentração é de 150mg cada. Ambos são administrados via oral, preferencialmente acompanhados de alimentos, já que os mesmos aumentam sua biodisponibilidade (CASTRO *et al.*, 2000). Pode ser administrado em dose única de 50 mg/kg de peso para adultos e de 60 mg/kg de peso para crianças (BRASIL, 2014).

De acordo com Hinrichsen (2005) a dosagem habitual é de 40 a 60 mg/kg em dose única. A taxa de cura com doses de apenas 40 mg/kg chegou a 78% em tratamentos realizados no Brasil, demonstrando assim sua eficácia (REY *et al.*, 2001).

O PZQ se enquadra na categoria B da FDA (Food and Drug Administration) e isso implica na sua não utilização por crianças abaixo de 04 anos e tampouco por mulheres grávidas, uma vez que metabólitos são excretados pelo leite materno (BRASIL, 2006), fazendo com que a falta de uma formulação pediátrica seja um dos maiores entraves no tratamento, tendo em vista que crianças estão em grupos de maior vulnerabilidade à infecção por parasitas. Em função de seu uso há décadas e aos relatos na literatura de resistência ao PZQ, grupos de pesquisa buscam alternativas para o tratamento da esquistossomose.

A Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) em parceria com a empresa Orygen Biotecnologia S.A. vem desenvolvendo uma vacina para a esquistossomose. Estudos de Santini-Oliveira *et al.* (2016), pertencentes ao grupo da pesquisadora Miriam Tandler,

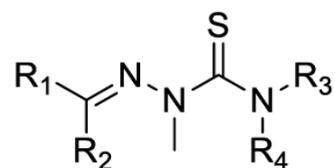
Utilizam a proteína Sm-14 proveniente do tegumento do *S. mansoni* para assim criar uma memória imunológica, a fim de que ao ser reconhecido pelo sistema imune, o tegumento do parasito possa ser alvo, culminando em sua eliminação. Contudo, o desenvolvimento de vacina é um processo caro e que demanda tempo.

Dentro deste quadro, alternativas terapêuticas quimioterápicas são buscadas diariamente através de modificações químicas a fim de obter moléculas com atividade esquistossomicida.

2.6 TIOSSEMICARBAZONAS

As tiossemicarbazonas e seus derivados são uma importante classe de compostos orgânicos devido as suas inúmeras atividades biológicas e químicas (CZUBATKA-BIEN´KOWSKA et al., 2017). As tiossemicarbazonas apresentam-se normalmente com uma estrutura $R_1R_2C=N-NH-CS-NH_2$ (HUSSEIN et al., 2015) (Fig. 7). Os seus derivados são formados pela condensação do átomo de nitrogênio terminal do grupo hidrazina da tiossemicarbazona com grupo carbonilo de uma cetona ou um alifático ou aldeído aromático (CZUBATKA-BIEN´KOWSKA et al., 2017).

Figura 07. Esqueleto básico de uma tiossemicarbazona.



Fonte: HUSSEIN et al. (2015)

As atividades das tiossemicarbazonas vêm sendo estudadas desde 1956, quando estudos de Brockman demonstraram atividade antitumoral dos derivados da 2-formylpyridine tiossemicarbazona (SUBHASHREE et al., 2017). A exploração das propriedades antivirais, antibacterianas e antitumorais das tiossemicarbazonas e seus complexos metálicos têm estimulado inúmeras investigações relacionadas à catálise e à importância biológica (HUSSEIN et al., 2015).

Estudos de Oliveira et al. (2017) demonstraram que tiossemicarbazonas são promissoras em terapia anticâncer, uma vez que o composto 2b que tem a presença de porções indol, tiossemicarbazonas e porção naftaleno. Atividades anti-tripanosomatídea foi

comprovada através de estudos de Espíndola et al. (2015), onde células epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram incubadas com tiossemicarbazonas a fim de se avaliar o potencial de inibição celular. Graser-Loescher et al. (2017) mostraram que tiossemicarbazonas foram eficazes no controle de células tumorais de leucemia *in vitro*.

Estudos de atividade esquistossomicida de tiossemicarbazonas foram realizados por Santiago et al. (2015), onde vermes adultos de *S. mansoni* foram desafiados com tiossemicarbazonas (LpQM 01,02,03 e 38), tiazóis (LpQM 14, 17, 43, 45 e 47) e tiazolidinonas (LpQM 40) da série LpQM, onde apenas os compostos LpQM 14, 17, 43, 45 e 47 apresentaram atividades, sendo eficazes contra os análogos de outras classes.

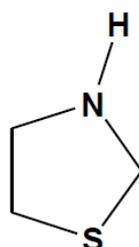
2.7 TIAZOLIDINAS

As tiazolidinas são um grupo de moléculas que se caracterizam quimicamente pela presença de um anel heterocíclico de 5 membros, tendo 3 carbonos, 1 átomo de enxofre na posição 1 do anel e um átomo de nitrogênio na posição 3 (Fig. 8) (ASSATI et al., 2014).

Com o aprimoramento da química voltada para os estudos biológicos, modificações podem ser feitas nas estruturas das moléculas a fim de que sejam mais eficazes, menos tóxicas e mais seletivas aos alvos biológicos. A literatura já relata tiazolidinas e suas inúmeras atividades biológicas, tais quais, antidibética (TSUYOSHI et al., 2002), anti-inflamatória (BARROS et al., 2010), anti-oxidante (SWATHI et al. 2012), anti-tubercular (PATTAN et al., 2008), anti-microbiana (OYA et al., 2007), e atividade citotóxica (SHANKAR et al., 2012).

Contudo, a literatura não reporta nenhum trabalho sobre a ação de tiazolidinas frente ao *S. mansoni*, fazendo com que haja a necessidade de avaliar o seu potencial de ação frente a este parasito.

Figura 08. Anel tiazolidínico.



Fonte: ASSATI et al. (2014)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

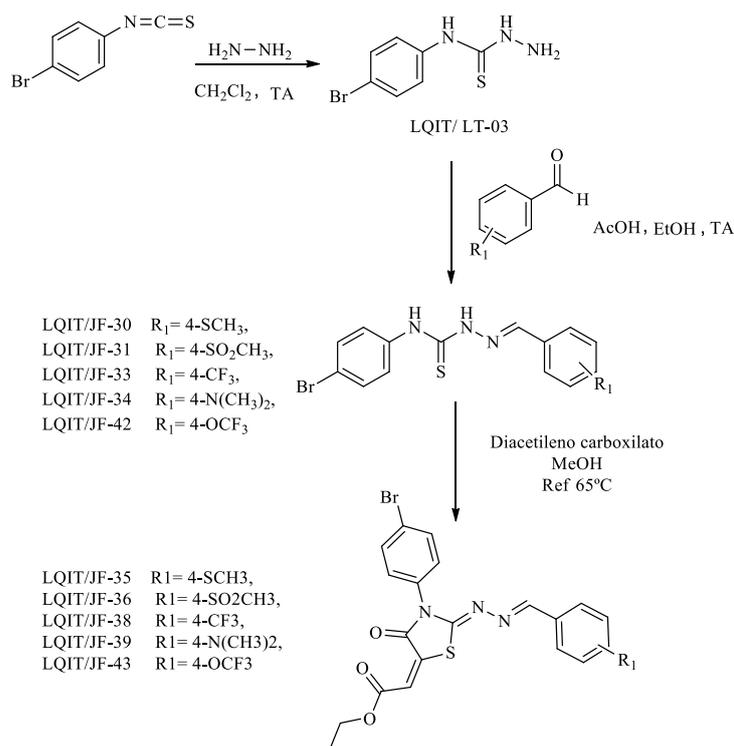
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para obtenção dos vermes jovens e adultos, foram utilizados camundongos *Swiss webster* com 30g, de ambos os sexos, para a infecção com a cepa LE (Belo Horizonte) de *S. mansoni* mantidas no Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE. Os animais receberam a carga parasitária de 300 cercárias para os estudos com vermes jovens e 120 cercárias para vermes adultos. O período de incubação da parasitose foi de 30 dias e 45 dias, respectivamente, para vermes jovens e adultos.

3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS DERIVADOS TIOSSEMICARBAZONAS E TIAZOLIDINAS

As sínteses dos derivados em estudo foram realizadas no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica – LQIT/UFPE, no Departamento de Antibióticos e os derivados foram cedidos ao estudo pela Prof. Dr^a Maria do Carmo Alves de Lima. O esquema 1 apresenta a rota de síntese empregada na obtenção dos compostos intermediários, as tiossemicarbazonas, e o produto final, os ésteres 4-tiazolidínicos 5-substituídos.

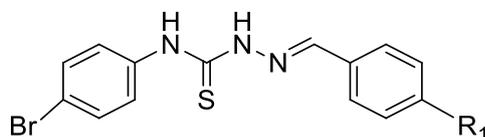
Seguindo metodologia sintética já consolidada pelo Laboratório de Química e Inovação Terapêutica e descrita por Leite et al. (2016), através de síntese de adição clássica entre bromo-isotiocianato e hidrazina obteve-se a tiossemicarbazida comum para todas as novas tiossemicarbazonas sintetizadas. A partir das mesmas, seguiu-se com metodologia de ciclização, afim da obtenção de derivados 4-tiazolidínicos substituídos com a função éster na posição 5, obtendo-se cinco novos derivados, candidatos a fármacos antiparasitários.



Esquema 1. Rota sintética empregada na obtenção dos 5 novos derivados tiossemicarbazônicos e 5-substituídos 4-tiazolidínicos.

A caracterização físico-química foi realizada através da determinação dos seguintes parâmetros: Ponto de Fusão (PF) e Razão de Frente (Rf) (Tabela 1 e 2). Já para a análise estrutural utilizou-se de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN¹H), Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze (RMN¹³C), espectroscopia de absorção vibracional na região do infravermelho (IV) e Espectrometria de Massas (EM).

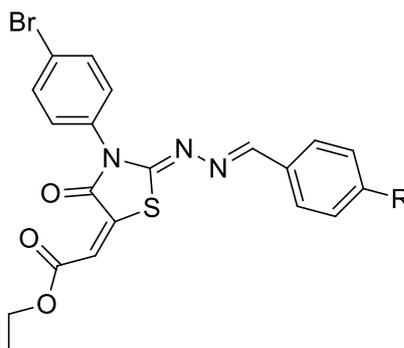
Tabela 1. Propriedades físico-químicas e rendimentos para tiossemicarbazonas da série *N*-(4-bromofenil)-hidrazina-carbotiamida.



Compostos	R ₁	Rend. (%)	PF °C	Caracterização	Massa Molecular (g/mol)	LogP	Rf / eluente
LQIT/JF-30	4-SCH ₃	92	196-197	Sólido amarelo	380,33	5,15	<i>n</i> -hex.:AcEtO (7:3) / 0,44
LQIT/JF-31	4-SO ₂ CH ₃	90	220-222	Sólido branco	412,32	3,42	<i>n</i> -hex.:AcEtO (4,5:5,5) / 0,52
LQIT/JF-33	4-CF ₃	77	199-200	Sólido branco	402,23	5,63	<i>n</i> -hex.:AcEtO (8:2) / 0,42

LQIT/JF-34	4-N(CH ₃) ₂	75	200-201	Sólido amarelo	377,30	5,0	<i>n</i> -hex.:AcEtO (7:3) / 0,44
LQIT/JF-42	4-OCF ₃	80	192-193	Sólido branco	418,23	6,24	<i>n</i> -hex.:AcEtO (8:2) / 0,36

Tabela 2. Propriedades físico-químicas e rendimentos para os derivados da série (*E*)-etil-2-((*Z*)-2-(*E*)-benzilidenohidrazona)-3-(4-bromofenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato.



Compostos	R ₁	Rend. (%)	PF °C	Caracterização	Massa Molecular (g/mol)	LogP	R _f / eluente
LQIT/JF-35	4-SCH ₃	70	196-198	Sólido amarelo	504,42	5,61	<i>n</i> -hex.:AcEtO (8:2) / 0,45
LQIT/JF-36	4-SO ₂ CH ₃	76	246-248	Sólido amarelo	536,42	3,88	<i>n</i> -hex.:AcEtO (6:4) / 0,44
LQIT/JF-38	4-CF ₃	63	204-205	Sólido amarelo	542,33	6,09	<i>n</i> -hex.:AcEtO (9:1) / 0,40
LQIT/JF-39	4-N(CH ₃) ₂	79	220-221	Sólido laranja	501,40	5,46	<i>n</i> -hex.:AcEtO (8:2) / 0,50
LQIT/JF-43	4-OCF ₃	71	195-196	Sólido amarelo	542,33	6,7	<i>n</i> -hex.:AcEtO (9:1) / 0,52

3.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE *in vitro*

As análises de citotoxicidade foram realizadas através da técnica do MTT, descrita por Mosmann (1983). Células VERO foram tratadas com diferentes concentrações das tiossemicarbazonas e tiazolidinas (200 µM/mL a 12,5 µM/mL) por 24h. Em seguida, lavadas em meio RPMI e incubadas a uma concentração de 5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído em meio RPMI sem vermelho de fenol, por 3 horas a 37°C. Posteriormente, as células foram solubilizadas em DMSO (100µL/poço) e a absorbância medida a 540 nm em espectrofotômetro Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). Os experimentos foram realizados em quadruplicatas técnica e duplicata biológica.

Para determinação da CC₅₀ foi realizada uma regressão linear através do *software* estatístico IBM SPSS Statistics 25.

3.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA *in vitro* EM VERMES JOVENS E ADULTOS DE *S. mansoni*

Os parasitos foram removidos dos camundongos após 30 e 45 dias de infectados, respectivamente para vermes jovens e adultos, através da perfusão do sistema porta-hepático e em seguida lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20mM, pH = 7,5 e suplementado com penicilina (100UI/ml), estreptomicina (100µg/mL) e SFB a 10%. Após a lavagem, foram transferidos para placas de cultura de tecidos contendo 2mL de meio. Cada poço recebeu quatro vermes, e em seguida foram incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 1 hora de adaptação ao meio, os compostos foram adicionados nas concentrações de 200µM/mL a 12,5µM/mL. Os parasitos foram mantidos em cultura por 05 dias (120 horas) e analisados a cada 24h em microscópio invertido, observando oviposição, morfologia e mortalidade e mobilidade proposta por Ramizes et al. (2007) adaptada aos experimentos, atribuindo-se um *score* de: 0 para vermes mortos; 1 para vermes muito lentos com movimentos ocasionais; 2 para vermes com movimentação de cabeça e cauda, porém com mobilidade reduzida e 3 para vermes com morfologia e movimentação normais.

3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Após observação, os grupos que apresentaram 100% de mortalidade em 24h tiveram os parasitos retirados e posteriormente foram lavados em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.2 para posterior fixação em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, glutaraldeído a 2,5% e PFA a 4%. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,1M por 90 minutos em ausência de luz. Em seguida foram realizadas três lavagens em tampão cacodilato 0,1M para posterior desidratação, utilizando uma 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. O material seco foi montado 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 Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO 1 - AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ESQUISTOSSOMICIDA E ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DE TIOSSEMICARBAZONAS E TIAZOLIDINAS FRENTE À VERMES JOVENS E ADULTOS DE *S. mansoni*

ARTIGO ESCRITO NAS NORMAS DO PERIÓDICO - MEMÓRIAS DO INSTITUTO OSWALDO CRUZ



ROCHA, R.E.T^{1,3}; ALVES-JÚNIOR, A.S.A²; JUNIOR, N.C.P^{1,3}; FRANÇA, I.R.S^{1,3}; RIBEIRO, K.R.C^{1,3}; NASCIMENTO, A.V^{1,3}; GONÇALVES, G.G.A^{1,3}; LIMA, M.H.H¹; LEITE, N.M.S²; OLIVEIRA, J.F²; LIMA, M.C.A²; FEITOSA, A. P.S^{1,3}; BRAYNER, F.A.^{1,3}; ALVES, L.C^{1,3}

¹ Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – Universidade Federal de Pernambuco – Campus da UFPE;

² Laboratório de Química e Inovação Terapêutica – Departamento de Antibióticos – Centro de Biociências – Universidade Federal de Pernambuco;

³ Laboratório de Biologia Celular e Molecular - Departamento de Parasitologia - Instituto Aggeu Magalhães — Campus da UFPE.

Resumo: A esquistossomose é uma doença negligenciada que afeta cerca de 258 milhões de pessoas mundialmente e matam 500 mil por ano. Causada pelo helminto *Schistosoma mansoni*, no Brasil está presente em 19 estados e no Distrito Federal. O tratamento preconizado pela OMS é feito exclusivamente com o praziquantel, apesar da grande problemática pela sua baixa eficácia em fases juvenis dos parasitas e efeitos adversos nos pacientes. As tiossemicarbazonas e tiazolidinas são grupos químicos que já apresentam

grande espectro de atividade biológica, e com modificações nos radicais, podem se tornar mais eficazes e mais seletivas aos alvos biológicos. Várias séries dos grupos químicos tiossemicarbazonas e tiazolidinas vem sendo desenvolvidos e testados. Para avaliar a ação destas moléculas frente ao *Schistosoma mansoni*, compostos da série JF-LqIT/UFPE foram sintetizados: JF30, JF31, JF33, JF34, JF35, JF36, JF38, JF39, JF42 e JF43. Foram avaliados a citotoxicidade em células VERO, atividade esquistossomicida *in vitro* para vermes jovens e adultos e alterações ultraestruturais. O composto JF35 apresentou CC_{50} de $724,13\mu\text{M}$, sendo menos citotóxicos que o PZQ que teve como índice $658,30\mu\text{M}$. Os compostos JF39 e JF42 apresentaram índices de $622,27\mu\text{M}$ e $609,83\mu\text{M}$, respectivamente. Os compostos JF30, JF31, JF33, JF34, JF36, JF38 e JF43 foram mais citotóxicos que o controle positivo. Os compostos JF31 e JF43, apresentaram 100% de mortalidade em 24h na dose de $200\mu\text{M}$ para vermes adultos e 48h para jovens. Foram avaliados parâmetros de motilidade, mortalidade e oviposição: JF31 e JF43 apresentaram *score* 0 em 24h, significando ausência total de movimentos, não apresentaram ovos e danos tegumentares foram observados em microscopia ótica. Através de microscopia eletrônica de varredura tais alterações tegumentares foram observados danos estruturais causados pelos compostos JF31 e JF43, como: exposição da musculatura, formação de bolhas tegumentares, tegumentos com morfologia anormal e destruição de tubérculos e espículas. O composto JF31 apresentou-se 2,39 vezes mais seletivo para vermes adultos e JF43 foi 3,74 vezes mais seletivo para vermes jovens. Assim, os compostos JF31 e JF43, demonstraram-se os mais promissores por apresentarem atividade esquistossomicida nas formas juvenis e adultas de *S. mansoni*.

Palavras-chaves: Tiossemicarbazonas, Tiazolidinas, *Schistosoma mansoni*, Atividade Biológica.

Introdução: A esquistossomose está presente em regiões tropicais e subtropicais, afetando 258 milhões de pessoas e expondo 779 milhões ao risco de infecção (Colley *et al.* 2014; Aires *et al.* 2014; Matos-Rocha *et al.* 2016). No Brasil, estima-se que a parasitose ocorra em 19 dos 26 estados e no Distrito Federal. O medicamento utilizado para o tratamento da esquistossomose mansônica é o praziquantel (PZQ). Estudos de Silva *et al.* (2017), demonstram a grande quantidade de efeitos adversos associados ao uso de PZQ, tais quais náuseas, vômitos, desconforto abdominal, anorexia e diarreia. A partir dos avanços da Química Medicinal Inorgânica, o amplo espectro de atividade biológica das tiossemicarbazonas tem sido descoberto, como anticâncer (Oliveira *et al.* 2017), anti-

tripanossomatídea (Espíndola *et al.* 2015), anti-leucemia (Graser-Loescher *et al.* 2017). As tiazolidinas são derivados indólicos, grupo com grande atividade e que podem ser modificados os radicais ligantes com a finalidade de aumentar o raio de ação biológica e/ou direcionar a ação, diminuindo os efeitos aos seres humanos. Baseando-se no princípio que o Brasil é um país acometido com um alto número de parasitoses, e que elas se apresentam como um grave problema de saúde pública pela sua relevância clínica e epidemiológica, o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos é uma prioridade. Tendo em vista que no Brasil existe apenas um fármaco disponível para o tratamento da esquistossomose, este causa efeitos colaterais e possui baixa eficácia na fase jovem do parasita, o desenvolvimento da química orgânica tem permitido o aprimoramento da estrutura de novas moléculas de tiossemicarbazonas e tiazolidinas para que atuem com maior seletividade a agentes patogênicos, sem causar danos ao hospedeiro. Desta forma, este trabalho objetiva avaliar a atividade biológica da série JF/LqIT – UFPE, frente ao *S. mansoni*, em suas fases juvenis e adulta, através de testes *in vitro*.

Materiais e Métodos

Animais experimentais

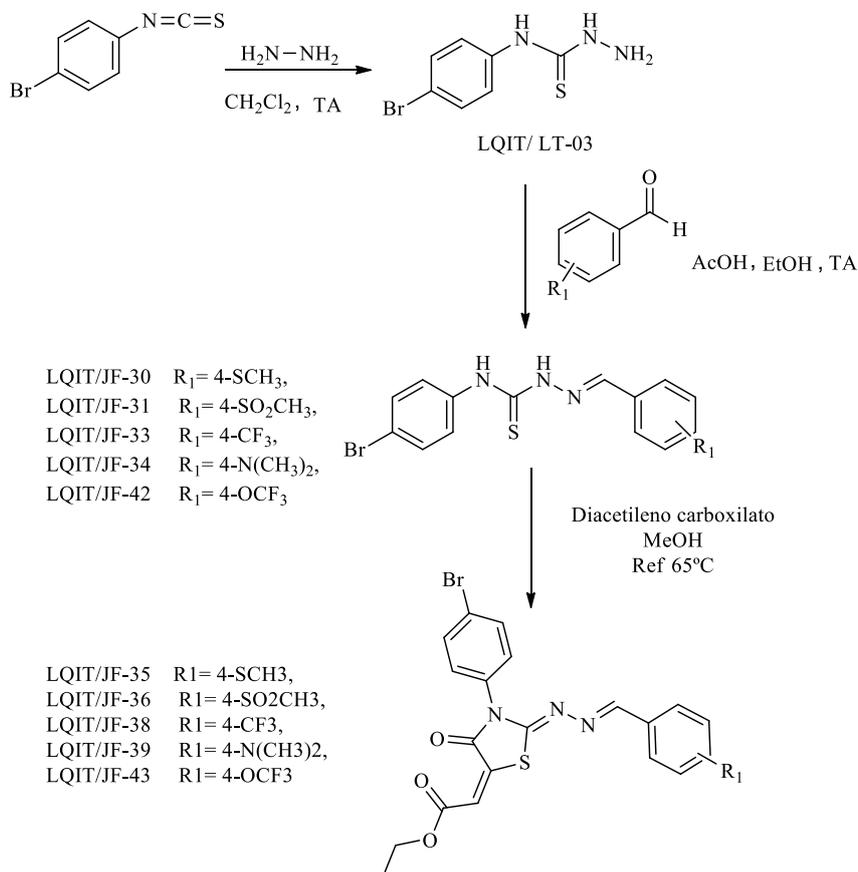
Para obtenção dos vermes jovens e adultos, foram utilizados camundongos *Swiss webster* com 30g, de ambos os sexos, para a infecção com a cepa LE (Belo Horizonte) de *S. mansoni* mantidas no Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE. Os animais receberam a carga parasitária de 300 cercárias para os estudos com vermes jovens e 120 cercárias para vermes adultos. O período de incubação da parasitose foi de 30 dias e 45 dias, respectivamente, para vermes jovens e adultos.

Síntese e caracterização dos derivados tiossemicarbazonas e tiazolidinas

As sínteses dos derivados em estudo foram realizadas no Laboratório de Química e Inovação Terapêutica – LQIT/UFPE, no Departamento de Antibióticos e os derivados foram cedidos ao estudo pela Prof. Dr^a Maria do Carmo Alves de Lima. O esquema 1 apresenta a rota de síntese empregada na obtenção dos compostos intermediários, as tiossemicarbazonas, e o produto final, os ésteres 4-tiazolidínicos 5-substituídos.

Seguindo metodologia sintética já consolidada pelo Laboratório de Química e Inovação Terapêutica e descrita por Leite *et al.* (2016), através de síntese de adição clássica entre bromo-isotiocianato e hidrazina obteve-se a tiossemicarbazida comum para todas as

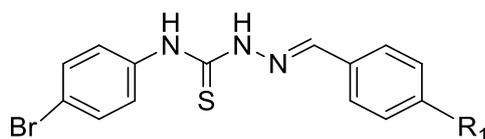
novas tiossemicarbazonas sintetizadas. A partir das mesmas, seguiu-se com metodologia de ciclização, afim da obtenção de derivados 4-tiazolidínicos substituídos com a função éster na posição 5, obtendo-se cinco novos derivados, candidatos a fármacos antiparasitários.



Esquema 1. Rota sintética empregada na obtenção dos novos derivados tiossemicarbazônicos e 4-tiazolidínicos 5-substituídos.

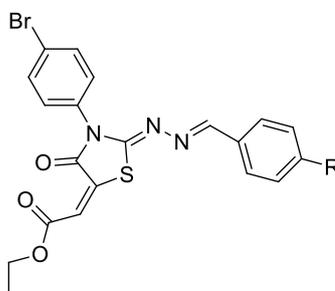
A caracterização físico-química foi realizada através da determinação dos seguintes parâmetros: Ponto de Fusão (PF) e Razão de Frente (Rf) (Tabela 1 e 2). Já para a análise estrutural utilizou-se de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN¹H), Ressonância Magnética Nuclear de carbono treze (RMN¹³C), espectroscopia de absorção vibracional na região do infravermelho (IV) e Espectrometria de Massas (EM).

Tabela I. Propriedades físico-químicas e rendimentos para tiossemicarbazonas da série *N*-(4-bromofenil)-hidrazina-carbotiamida.



Compostos	R1	Rend. (%)	PF °C	Caracterização	Massa Molecular (g/mol)	LogP	Rf / eluente
LQIT/JF-30	4-SCH ₃	92	196-197	Sólido amarelo	380,33	5,15	<i>n</i> -hex.:AcEtO (7:3) / 0,44
LQIT/JF-31	4-SO ₂ CH ₃	90	220-222	Sólido branco	412,32	3,42	<i>n</i> -hex.:AcEtO (4,5:5,5) / 0,52
LQIT/JF-33	4-CF ₃	77	199-200	Sólido branco	402,23	5,63	<i>n</i> -hex.:AcEtO (8:2) / 0,42
LQIT/JF-34	4-N(CH ₃) ₂	75	200-201	Sólido amarelo	377,30	5,0	<i>n</i> -hex.:AcEtO (7:3) / 0,44
LQIT/JF-42	4-OCF ₃	80	192-193	Sólido branco	418,23	6,24	<i>n</i> -hex.:AcEtO (8:2) / 0,36

Tabela II. Propriedades físico-químicas e rendimentos para os derivados da série (*E*)-etil-2-((*Z*)-2-(*E*)-benzilidenohidrazona)-3-(4-bromofenil)-4-oxotiazolidin-5-ilideno) acetato.



Compostos	R1	Rend. (%)	PF °C	Caracterização	Massa Molecular (g/mol)	LogP	Rf / eluente
LQIT/JF-35	4-SCH ₃	70	196-198	Sólido amarelo	504,42	5,61	<i>n</i> -hex.:AcEtO (8:2) / 0,45
LQIT/JF-36	4-SO ₂ CH ₃	76	246-248	Sólido amarelo	536,42	3,88	<i>n</i> -hex.:AcEtO (6:4) / 0,44
LQIT/JF-38	4-CF ₃	63	204-205	Sólido amarelo	542,33	6,09	<i>n</i> -hex.:AcEtO (9:1) / 0,40
LQIT/JF-39	4-N(CH ₃) ₂	79	220-221	Sólido laranja	501,40	5,46	<i>n</i> -hex.:AcEtO (8:2) / 0,50
LQIT/JF-43	4-OCF ₃	71	195-196	Sólido amarelo	542,33	6,7	<i>n</i> -hex.:AcEtO (9:1) / 0,52

Tabela III – Códigos e estruturas químicas das tiossemicarbazonas e tiazolidinas da série JF (LqIT/UFPE) utilizadas no estudo.

Composto	Estrutura	Composto	Estrutura
JF30		JF35	
JF31		JF36	
JF33		JF38	
JF34		JF39	
JF42		JF43	

Avaliação da Citotoxicidade *in vitro*

As análises de citotoxicidade foram realizadas através da técnica do MTT, descrita por Mosmann (1983). Células VERO foram tratadas concentrações de 200 $\mu\text{M}/\text{mL}$ a 12,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$ dos compostos por 24h. Em seguida, lavadas em meio RPMI e incubadas a uma concentração de 5 mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) diluído em meio RPMI, por 3 horas a 37°C. Posteriormente, as células foram solubilizadas em DMSO (100 $\mu\text{L}/\text{poço}$) e a absorbância medida a 540 nm em espectrofotômetro Benchmark plus (Bio-Rad®, Califórnia, EUA). Os experimentos foram realizados em quadruplicatas técnica e duplicata biológica. Para determinação da CC_{50} foi realizada uma regressão linear através do *software* estatístico IBM SPSS Statistics 25.

Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* em vermes jovens e adultos de *S. mansoni*

Os parasitos foram removidos dos camundongos após 30 e 45 dias de infectados, respectivamente para vermes jovens e adultos, através da perfusão do sistema porta-hepático. Em seguida, foram lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20mM, pH = 7,5 e suplementado com penicilina (100UI/ml), estreptomicina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e SFB a 10%. Após a lavagem, foram transferidos para placas de cultura de tecidos contendo 2mL de meio. Cada poço recebeu quatro vermes, e em seguida foram incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Após 1 hora de adaptação ao meio, os compostos foram adicionados nas concentrações de 200 $\mu\text{M}/\text{mL}$ a 12,5 $\mu\text{M}/\text{mL}$. Os parasitos foram mantidos em cultura por 05 dias (120 horas) e analisados a cada 24h em microscópio invertido, observando a mortalidade e mobilidade proposta por Ramizes *et al.* (2007) adaptada aos experimentos, atribuindo-se um *score* de: 0 para vermes mortos; 1 para vermes muito lentos com movimentos ocasionais; 2 para vermes com movimentação de cabeça e cauda, porém com mobilidade reduzida e 3 para vermes com morfologia e movimentação normais.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Após observação, os grupos que apresentaram 100% de mortalidade tiveram os parasitos retirados e posteriormente foram lavados em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, pH 7.2 para posterior fixação em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, glutaraldeído a 2,5% e PFA a 4%. A pós-fixação foi realizada em tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,1M por 90 minutos. Em seguida foram realizadas três lavagens em tampão cacodilato 0,1M para posterior desidratação, utilizando uma 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. O material seco foi montado 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 Núcleo de Plataformas Tecnológicas do Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ/PE.

Considerações Éticas

O projeto tem aprovação do Comitê de Ética em Uso de Animais do Instituto Aggeu Magalhães – CEUA/IAM, nº 104/2016 com validade até dezembro/2020.

Resultados

Citotoxicidade em células VERO

Comparados ao controle positivo (PZQ), que teve sua CC_{50} de 685,30 μ M, o composto JF35 apresentou CC_{50} de 724,13 μ M, sendo menos citotóxicos as células VERO. Os compostos JF39 e JF42 apresentaram citotoxicidade moderada, com valores de 622,27 μ M e 609,83 μ M, respectivamente. Os demais compostos foram mais tóxicos que o PZQ: JF30 – 271,50 μ M; JF31 – 293,34 μ M; JF33 – 455,46 μ M; JF34 – 466,65 μ M; JF36 – 503,46 μ M; JF38 – 401,49 μ M e JF43 – 374,05 μ M.

Apesar da toxicidade apresentada, os compostos mais promissores JF31 e JF43 apresentaram atividade esquistosomicida em concentrações abaixo do que foram determinadas pela CC_{50} (JF31 – 293,34 μ M e atividade esquistosomicida em 200 μ M; JF43 – 374,05 μ M e atividade esquistosomicida em 50 μ M).

Avaliação da atividade esquistosomicida *in vitro* em vermes jovens e adultos de *S. mansoni*

As tiossemicarbazonas e tiazolidinas da série JF (LqIT/UFPE) se mostraram eficazes contra vermes adultos e jovens de *S. mansoni*. Das 10 moléculas, 05 pertencem a classe das tiossemicarbazonas e 05 as tiazolidinas, tendo cada composto um análogo correspondente. Destas, 03 tiossemicarbazonas (JF30, JF31 e JF34) e 02 tiazolidinas (JF38 e JF43) apresentaram atividade esquistosomicida. Não houve atividade no grupo análogo à série, ou seja, a tiossemicarbazona que apresentou atividade não correspondeu à tiazolidina da série,

evidenciando que a estruturação química junto ao substituinte é o fator que sugere com que haja atividade direta sobre o *S. mansoni*.

Dez moléculas da série JF-LqIT/UFPE foram testadas contra vermes jovens e adultos de *S. mansoni*. Realizou-se uma triagem na dose de 200µM para definir no período de 24h a 120h quais moléculas teriam atividade frente aos parasitos. Apresentaram atividade sobre os vermes jovens os compostos JF31 (Tiossemicarbazona) e JF43 (Tiazolidina) e em vermes adultos os compostos JF30 (Tiossemicarbazona), JF31 (Tiossemicarbazona), JF34 (Tiossemicarbazona), JF38 (Tiazolidina) e JF43 (Tiazolidina).

Para vermes jovens, os compostos JF31 e JF43 apresentaram atividade na dose de 200µM com índices de mortalidade de 100% em 48h. Contudo, concentrações mais baixas não foram 100% efetivas, porém expressaram índices de mortalidade: JF31 nas concentrações de 50µM e 100µM apresentaram 25% de mortalidade em 48h de tratamento. O composto JF43 apresentou 100% de mortalidade na concentração de 50µM em 72h e nas doses de 100µM e 200µM, todos os parasitos estavam mortos em 48h (Tabela 04). Observou-se que no controle negativo (tratados com DMSO) os vermes apresentavam atividades normais, ou seja, estavam no *score* 3, nenhuma alteração a nível tegumentar foi percebida e os casais estavam ativos. Contudo, no controle positivo, o PZQ não foi eficaz em 100% dos parasitos, tendo sempre 01 verme (25%) que ao fim de 120h ainda se apresentava no *score* 1 dos parâmetros, ou seja, movimentos ocasionais das extremidades do corpo ou movimentação de glândulas vitelianas nas fêmeas (Tabela 05), evidenciando assim que o medicamento não é totalmente eficaz na fase jovem do *S. mansoni*.

Analisando vermes adultos, 05 moléculas apresentaram atividade esquistossomicida na dose de 200µM – JF30, JF31, JF34, JF38 e JF43, contudo, JF31 e JF43 apresentaram-se mais eficazes, atingindo 100% de mortalidade dos vermes em 24h. JF30 apresentou 50% de mortalidade em 120h; JF34 apresentou 25% de mortalidade em 100µM e 200µM em 120h; JF38 apresentou 25% de mortalidade em 100µM e 200µM em 24h (Tabela 06). Os controles positivos e negativos apresentaram-se dentro dos parâmetros esperados, tendo em vista que os parasitos tratados com o PZQ apresentaram *score* 0 em 24h e todos os vermes do controle negativo (DMSO) apresentaram com *score* 3 ao final de 120h (Tabela 07).

Análise Ultraestrutural

Os compostos JF31 e JF43 foram os que obtiveram 100% de mortalidade de vermes jovens e adultos de *S. mansoni* e por isto, foram analisados os efeitos de tais compostos frente a morfologia dos parasitos através da microscopia eletrônica de varredura.

Concomitantemente, os parasitos tratados com PZQ (Controle Positivo) e DMSO (Controle Negativo) também foram analisados a fim de obter-se material comparativo entre as diferentes micrografias.

Nos controles, os parasitos machos jovens apresentam ventosa oral e ventral bem delineadas, em seu tegumento uma grande quantidade de tubérculos em formação em meio as rugas paralelas e o canal ginecóforo (Fig. 1D - F). As fêmeas são maiores que os machos, mais finas e alongadas (Fig. 1A) e com um tegumento liso, apresentam uma grande quantidade de papilas sensoriais espalhadas pela extensão do corpo (Fig. 1C - 2D).

O controle positivo (PZQ) na dose de 10 μ M (Fig. 2A – 3F) mostrou-se eficaz frente ao tegumento dos vermes jovens.

O composto JF31 na concentração de 200 μ M após 48h de tratamento, os parasitos encontravam-se enovelados (Fig. 3A), e o seus tegumentos apresentavam destruição total dos tubérculos, além de erupções cutâneas, bolhas tegumentares e também descamação tegumentar (Fig. 3B - F). O composto JF43 na concentração de 100 μ M em 48h também demonstrou ação frente a vermes jovens machos de *S. mansoni*. Com morfologia contorcida (Fig. 4A - 5G), seus tegumentos apresentavam uma total destruição dos tubérculos, exposição da musculatura e uma grande quantidade de erupções.

No que concerne a vermes adultos, 05 compostos apresentaram atividade, contudo, JF30, JF34 e JF38 ao final de 120h não apresentaram 100% de mortalidade dos parasitos. JF31 e JF43 apresentaram 100% de atividade em 24h, mostrando-se eficazes comparados ao PZQ (controle positivo), que teve no mesmo período de tempo eficácia máxima observada. Nos vermes tratados com DMSO (controle negativo) apresentaram morfologia característica: as fêmeas apresentaram corpo cilíndrico e uniforme, com tegumento liso e a presença das papilas sensoriais (Fig. 5A - C) e os vermes machos apresentam ventosa oral e ventosa ventral bem delineadas, tegumento com a presença das rugas paralelas, papilas sensoriais, e tubérculos recobertos por espículas (Fig. 5D - H). O controle positivo, tratado com PZQ na dose de 10 μ M, (Fig. 6), apresenta uma grande atividade a nível tegumentar nos vermes adultos, provocando nas fêmeas uma morfologia contorcida, característica da ação neuromuscular do fármaco no parasita, exposição total da musculatura, a presença de bolhas tegumentares estouradas e descamação tegumentar, havendo assim maior exposição da musculatura interna do verme (Fig. 6A - D). Os vermes machos também se apresentam de maneira contorcida com a destruição dos tubérculos e espículas, exposição da musculatura e erosões (Fig. 6E - H).

JF31 foi 100% eficaz nas doses de 100 μ M em 48h e 200 μ M em 24h. A dose de 50 μ M foi eficaz 25% dos parasitos, contudo, todas as concentrações que apresentaram mortalidade, foram capazes de alterar morfológicamente os vermes adultos de *S. mansoni*. Na dose de 200 μ M (Fig. 7), as fêmeas se apresentavam contorcidas, com tegumentos anormais (enrugados), descamação tegumentar com exposição da musculatura por toda a superfície do verme (Fig. 7A - F). Já nos vermes machos, os tegumentos sofreram grandes alterações, principalmente com a destruição dos tubérculos e espículas e a presença de erosões (Fig. 7G - H).

Em relação ao composto JF43, apenas a concentração de 200 μ M foi eficaz em 100% dos vermes analisados. A Figura 8 evidencia as alterações morfológicas presentes: vermes enovelados (Fig. 8A), erosões, tegumento anormal, bolhas tegumentares, alterações das rugas paralelas e também da ventosa ventral (Fig. 8B - F).

Tabela IV – Atividade *in vitro* de tiossemicarbazonas e tiazolidinas frente a vermes jovens de *S. mansoni*

COMPOSTO	TEMPO	Índice de Mortalidade (%) / Concentrações Testadas ($\mu\text{M}/\text{mL}$)					CARACTERÍSTICA DOS VERMES OBSERVADOS
		200	100	50	25	12,5	
JF31	24	75	0	0	0	0	- Vermes contorcidos;
	48	100	25	25	0	0	- Casais desacasalados;
	72	100	25	25	0	0	- Tegumentos modificados.
	96	100	25	25	0	0	
	120	100	25	25	0	0	
JF43	24	75	0	0	0	0	- Vermes contorcidos;
	48	100	100	0	0	0	- Casais desacasalados;
	72	100	100	100	0	0	- Tegumentos modificados.
	96	100	100	100	0	0	
	120	100	100	100	0	0	

Tabela V – Mortalidade e motilidade dos vermes jovens de *S. mansoni* tratados com JF31, JF43 e controles (DMSO e PZQ- 10 μM) por 120h.

GRUPO	Percentual de Motilidade dos Vermes Jovens																								
	200 μM					100 μM					50 μM					25 μM					12,5 μM				
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0					
DMSO	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0					
PZQ	0	0	25	75	0	0	25	75	0	0	25	75	0	0	25	75	0	0	25	75					
JF31	0	0	0	100	0	0	75	25	0	0	75	25	0	100	0	0	0	100	0	0					
JF43	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	100	0	0	0	100	0	0					

Legenda: *Score* 0 - vermes mortos; 1 - vermes com movimentos ocasionais; 2 - vermes com movimentação reduzida (cabeça e cauda); 3 - morfologia e movimentação normais

Tabela VI – Atividade *in vitro* de tiossemicarbazonas e tiazolidinas frente a vermes adultos de *S. mansoni*

COMPOSTO	TEMPO	Índice de Mortalidade (%) / Concentrações Testadas ($\mu\text{M}/\text{mL}$)					CARACTERÍSTICA DOS VERMES OBSERVADOS
		200	100	50	25	12,5	
JF30	24	0	0	0	0	0	- Presença de ovos;
	48	0	0	0	0	0	- Acasalamento presente.
	72	0	0	0	0	0	
	96	0	0	0	0	0	
	120	50	0	0	0	0	
JF31	24	100	50	25	0	0	- Ausência de ovos;
	48	100	100	25	0	0	- Vermes contorcidos;
	72	100	100	25	0	0	- Casais desacasalados;
	96	100	100	25	0	0	- Tegumentos modificados.
	120	100	100	25	0	0	
JF34	24	0	0	0	0	0	- Vermes com mobilidade reduzida;
	48	0	0	0	0	0	- Casais desacasalados.
	72	0	0	0	0	0	
	96	0	0	0	0	0	
	120	25	25	0	0	0	
JF38	24	25	25	0	0	0	- Vermes com mobilidade reduzida;
	48	25	25	0	0	0	- Casais desacasalados.
	72	25	25	0	0	0	
	96	25	25	0	0	0	
	120	25	25	0	0	0	
JF43	24	100	0	0	0	0	- Ausência de ovos;
	48	100	50	25	0	0	- Vermes contorcidos;
	72	100	50	25	0	0	- Casais desacasalados;
	96	100	50	25	0	0	- Tegumentos modificados.
	120	100	50	25	0	0	

Tabela VII – Mortalidade e motilidade dos vermes adultos de *S. mansoni* tratados com JF30, JF31, JF34, JF38, JF43 e controles (DMSO e PZQ - 10µM) por 120h.

GRUPO	Percentual de Motilidade dos Vermes Adultos																			
	200 µM				100 µM				50 µM				25 µM				12,5 µM			
	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0	3	2	1	0
DMSO	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
PZQ	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100
JF30	50	0	0	50	0	100	0	0	0	0	0	100	100	0	0	0	100	0	0	0
JF31	0	0	0	100	0	0	0	100	0	25	0	75	100	0	0	0	100	0	0	0
JF34	0	75	0	25	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
JF38	50	25	0	25	75	0	0	25	75	25	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
JF43	0	0	0	100	0	0	50	50	75	0	0	25	100	0	0	0	100	0	0	0

Legenda: *Score* 0 - vermes mortos; 1 - vermes com movimentos ocasionais; 2 - vermes com movimentação reduzida (cabeça e cauda); 3 - morfologia e movimentação normais.

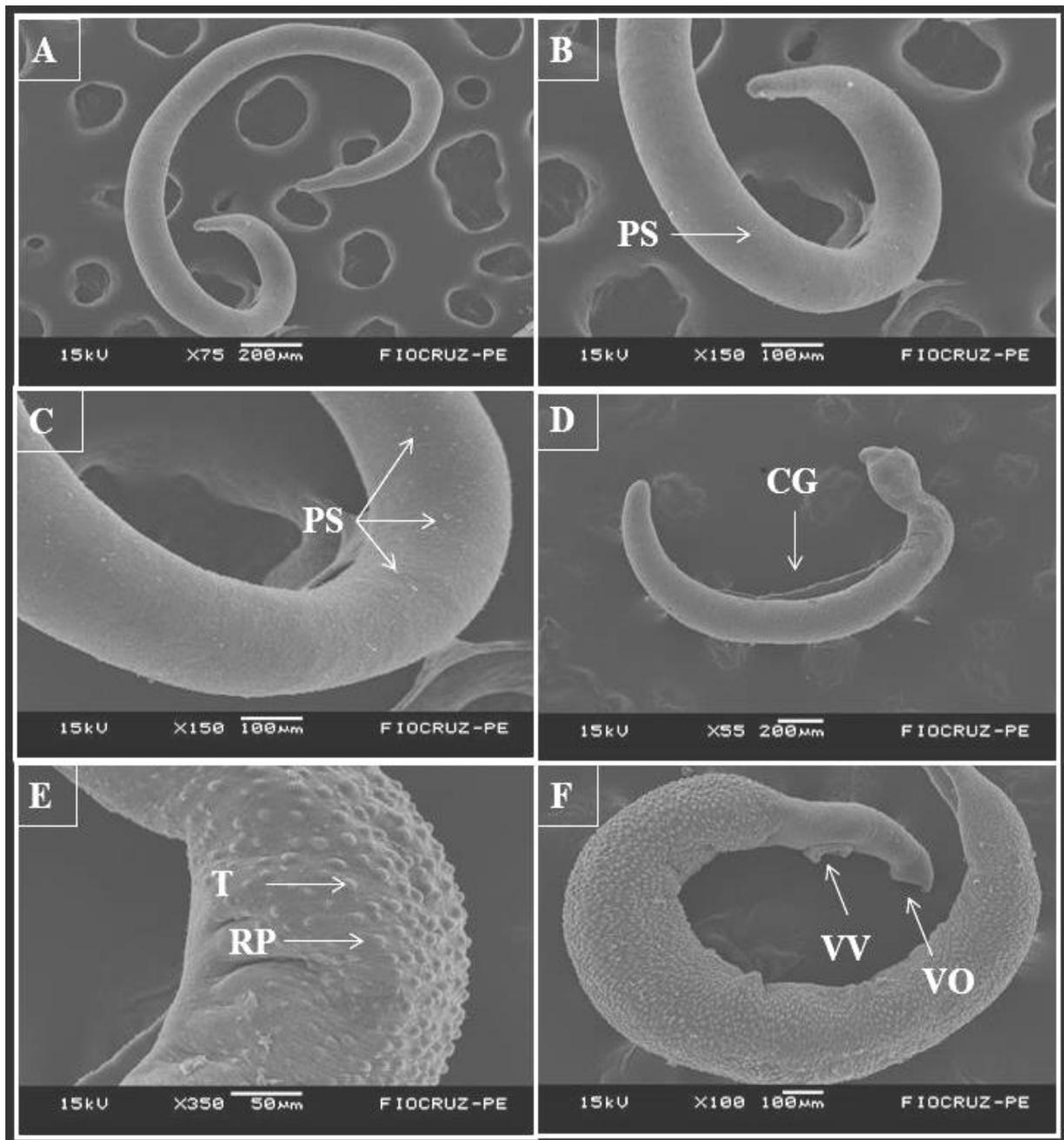


Figura 1 - Microscopia Eletrônica de Varredura de vermes jovens fêmeas e machos de *S. mansoni* do grupo controle negativo (DMSO). (A) Fêmea e sua morfologia característica. (B e C) Fêmea evidenciando papilas sensoriais (PS). (D) Morfologia de macho com apresentação do canal ginecóforo. (E) Tegumento do macho recoberto por rugas paralelas (RP) e tubérculos (T). (F) Macho evidenciando ventosa oral (VO) e ventosa ventral (VV).

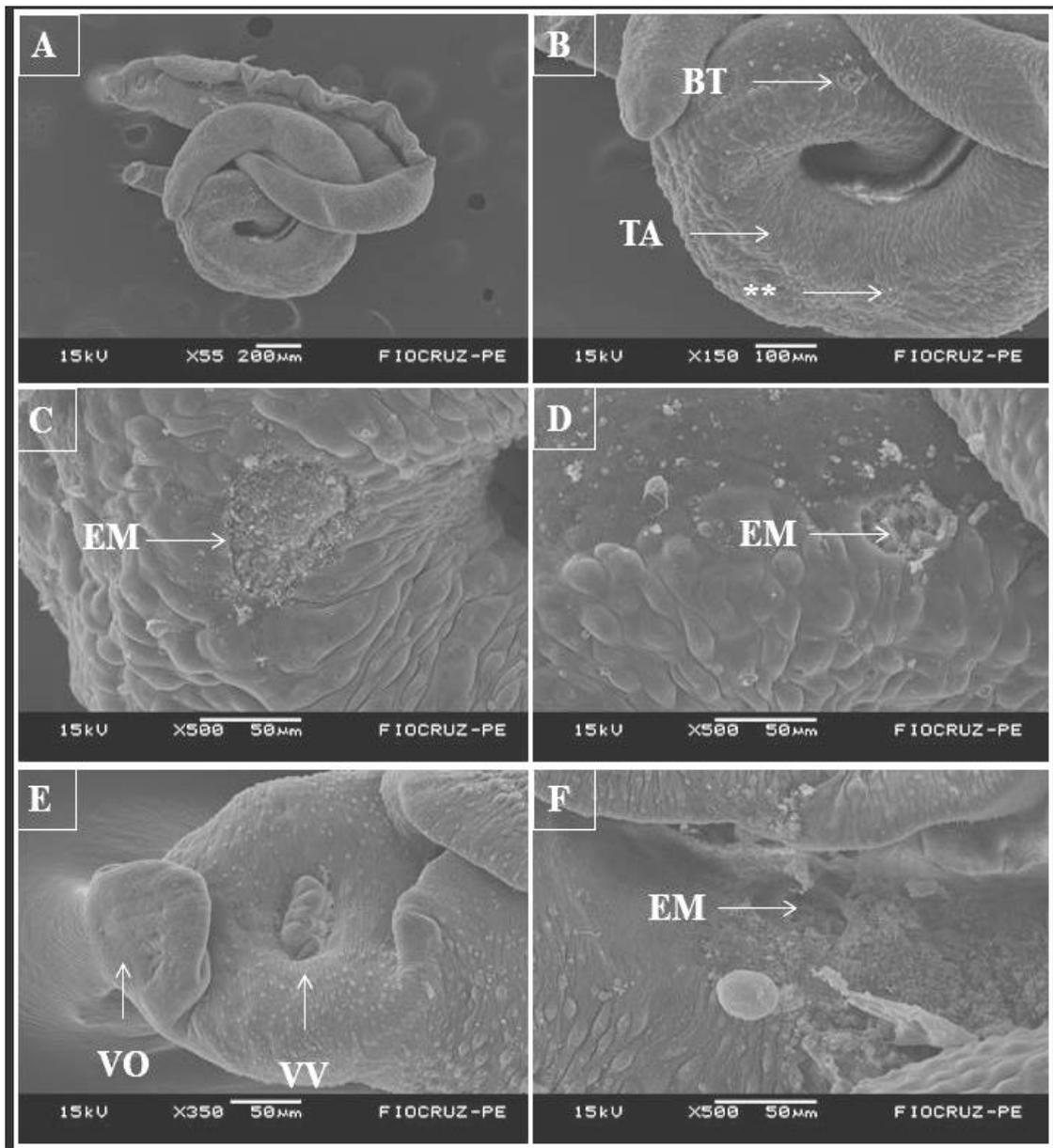


Figura 2 - Microscopia Eletrônica de Varredura de vermes jovens de *S. mansoni* do grupo controle positivo (PZQ) na dose de $10\mu\text{M}$ por 24h. (A) Vermes enovelados. (B) Tegumento com alterações morfológicas: bolhas tegumentares (BT), tegumento anormal (TA) e destruição dos tubérculos (**). (C, D) Exposição da musculatura (EM). (E) Ventosa oral (VO) e ventosa ventral (VV) retraídas. (F) Exposição de musculatura em detrimento de uma bolha tegumentar estourada.

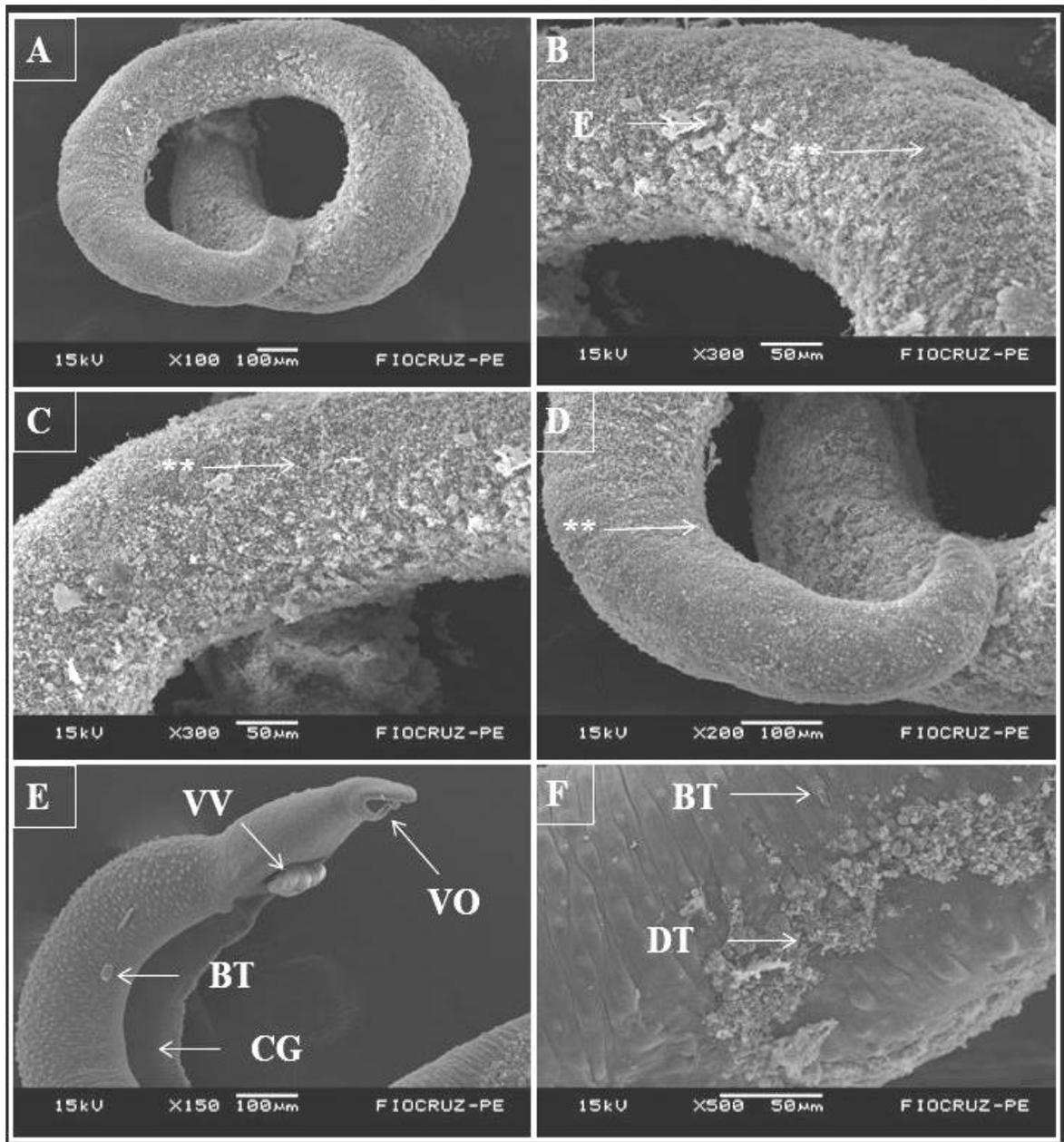


Figura 3 - Microscopia Eletrônica de Varredura de vermes jovens machos de *S. mansoni* tratados com JF31 200µM por 48h. (A) Macho enovelado. (B) Tegumento do verme macho apresentando destruição total dos tubérculos (**) e erosões (E). (C) e (D) Machos com destruição total dos tegumentos. (E) Estruturas morfológicas de machos, focando em uma bolha tegumentar (BT). (F) Macho com descamação tegumentar (DT).

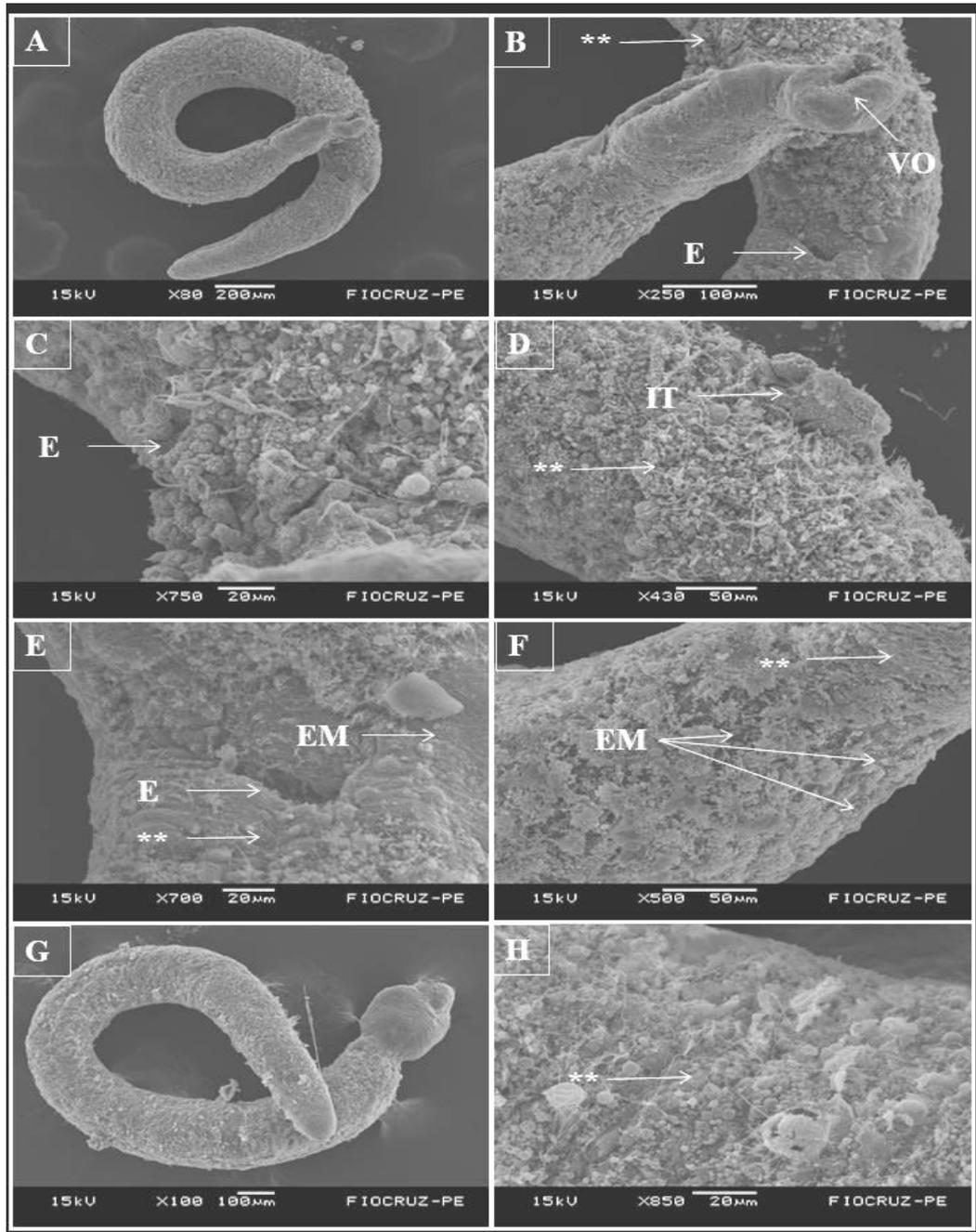


Figura 4 - Microscopia Eletrônica de Varredura de vermes jovens machos de *S. mansoni* tratados com JF43 100µM por 48h. (A) Macho envelado. (B - C) Tegumentos apresentando destruição total dos tubérculos (**), erosões (E) e exposição da musculatura (EM). (D) Verme adulto apresentando um grande inchaço tegumentar (IT). (E) Tegumento com uma grande erosão (E) no tegumento do verme adulto. (F) Tegumento com ausência dos tubérculos (**). (G) Verme macho envelado. (H) Danos tegumentares e a ausência de tubérculos (**).

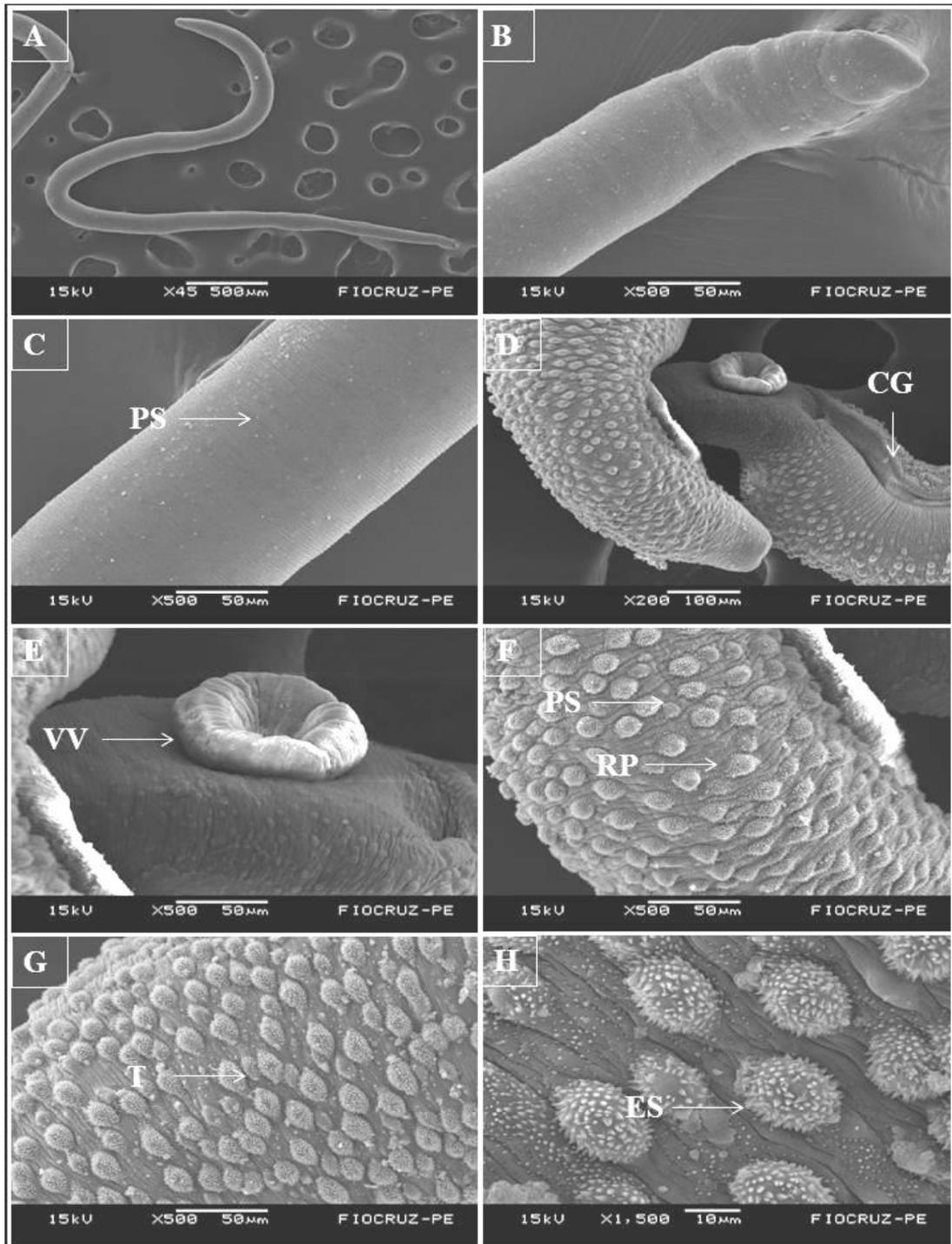


Figura 5 - Microscopia Eletrônica de Varredura de vermes fêmeas e machos de *S. mansoni* do grupo controle negativo (DMSO). (A) Fêmea e sua morfologia característica. (B, C) Fêmea evidenciando seu tegumento e suas papilas sensoriais (PS). (D) Morfologia de macho com apresentação do canal ginecóforo. (E) Morfologia característica da ventosa ventral (VV) de vermes machos. (F) Tegumento do verme macho com a presença das rugas paralelas (RP) e papilas sensoriais (OS). (G) Morfologia dos tubérculos (T). (H) Tubérculos com grande quantidade de espículas (ES).

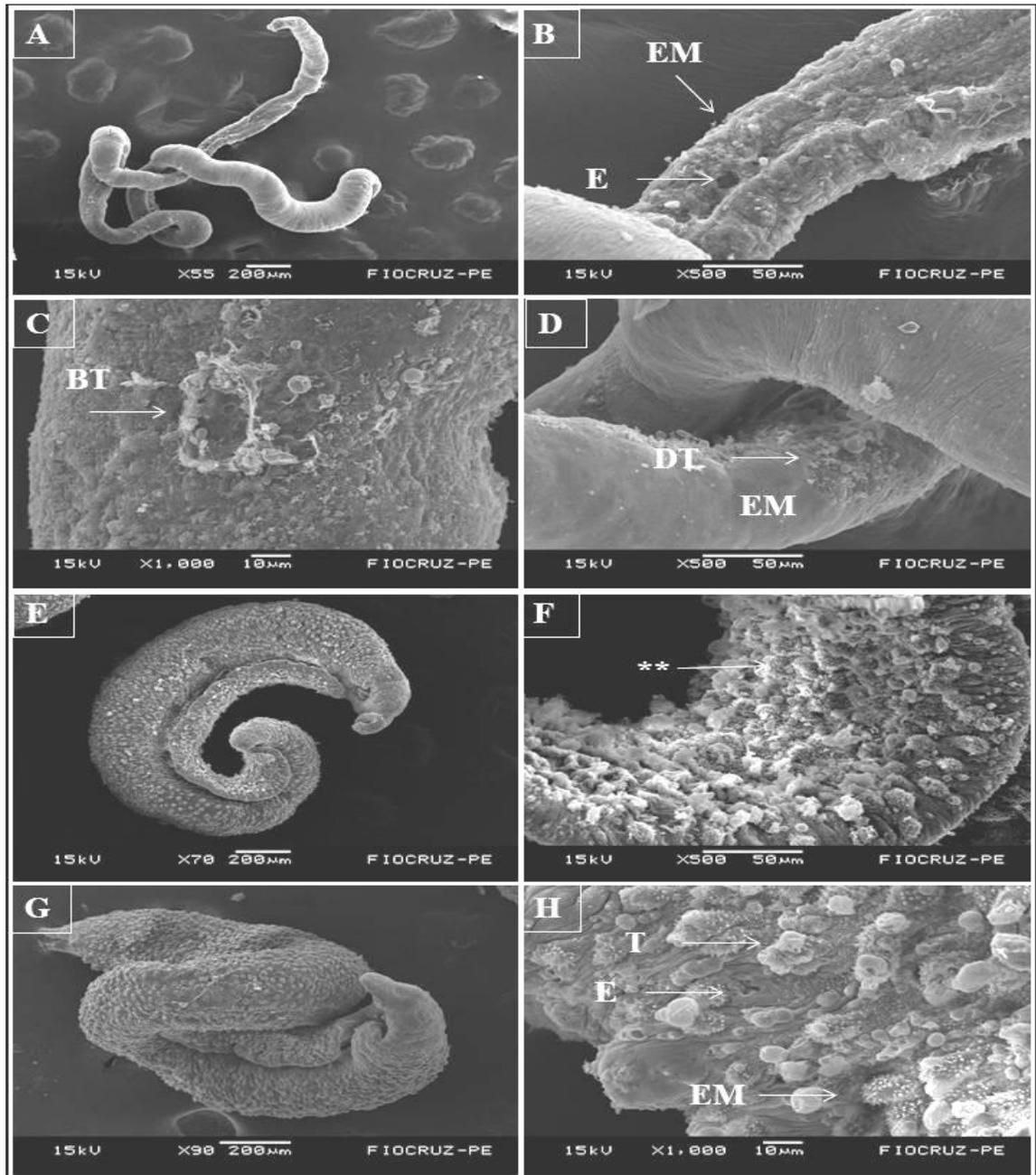


Figura 6 - Microscopia Eletrônica de Varredura de vermes adultos de *S. mansoni* do grupo controle positivo (PZQ) na dose de 10µM por 24h. (A) Fêmea contorcida. (B) Fêmea com ausência do tegumento e musculatura totalmente exposta (EM) e erosão (E). (C) Tegumento com uma bolha (BT). (D) Descamação tegumentar (DT) com exposição da musculatura (EM). (E) Verme macho enovelado. (F) Destruição total dos tubérculos e espículas (**). (G) Verme macho contorcido. (H) Tubérculos com morfologia anormal, erosão (E) e exposição da musculatura (EM).

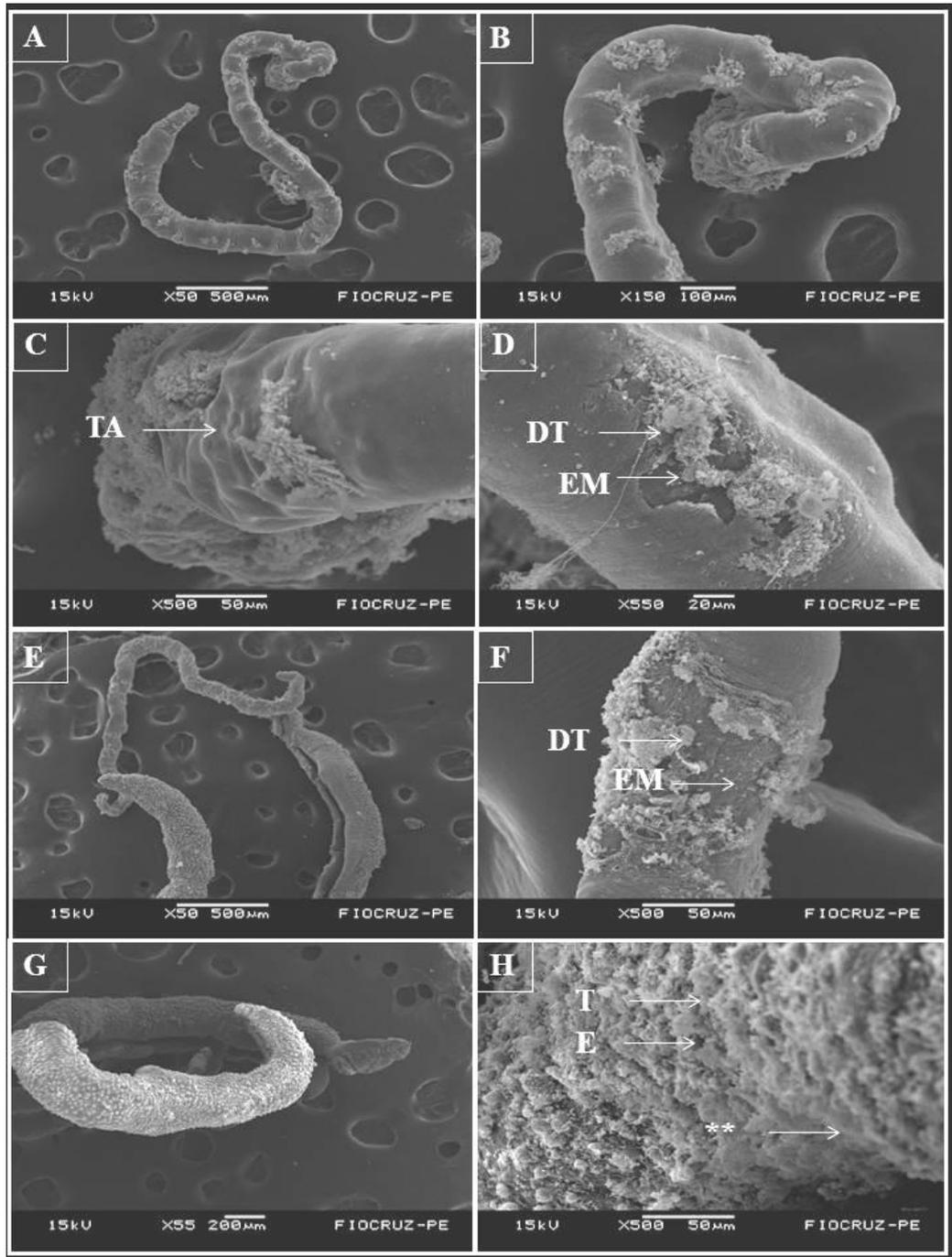


Figura 7 - Microscopia Eletrônica de Varredura de vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni* tratados com JF31 200µM por 24h. (A, B) Fêmea contorcida. (C) Tegumento da fêmea com morfologia fora do padrão (TA). (D) Tegumento com descamação (DT) e exposição da musculatura (EM). (E) Visão geral de macho e fêmea contorcidos. (F) Tegumento com descamação (DT) e exposição da musculatura. (G) Macho contorcido e enovelado. (H) Tegumento do verme macho apresentando destruição de tubérculos (T) e espículas (**), e erosão (E).

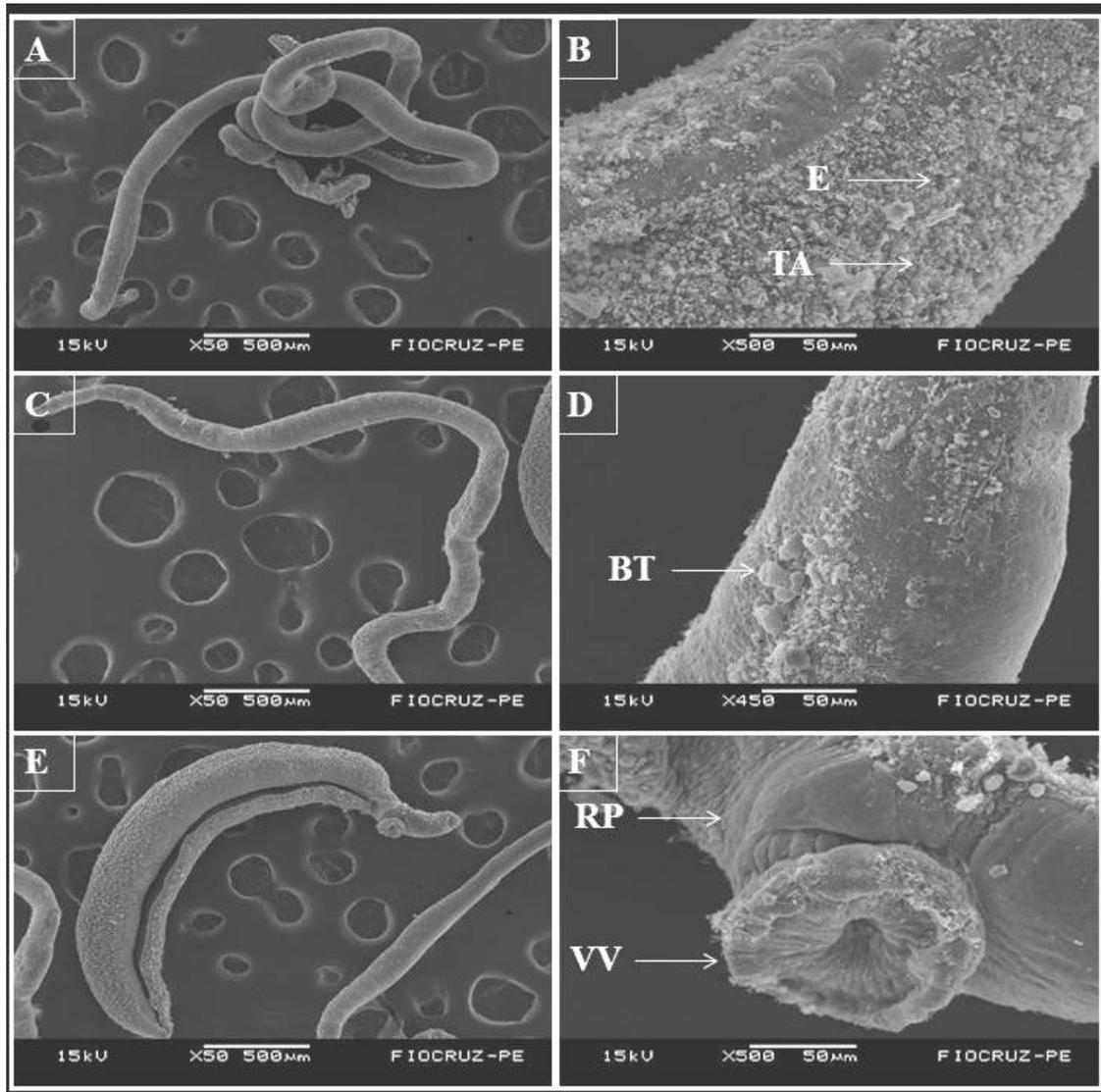


Figura 8 - Microscopia Eletrônica de Varredura de vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni* tratados com JF43 200µM por 24h. (A) Fêmeas contorcidas. (B) Tegumento anormal (TA) da fêmea apresentando erosão (E). (C) Fêmea com tegumento alterado. (D) Tegumento com bolhas (BT). (E) Verme adulto macho contorcido. (F) Verme macho com as rugas paralelas (RP) com padrões alterados e ventosa ventral (VV) com alterações morfológicas.

Discussão

A esquistossomose é uma doença negligenciada e tem como único tratamento no Brasil o Praziquantel (PZQ) (AIRES *et al.* 2014; MATOS-ROCHA *et al.* 2015).

Compostos tiazolidínicos já são descritos na literatura como bons agentes esquistossomicidas. Estudos de Santiago *et al.* (2015) demonstraram que o LpQM-45 (tiazol) foi eficaz quanto a mortalidade *in vitro* de vermes adultos de *S. mansoni*, resultados similares foram obtidos no presente estudo, onde dois compostos tiazolidínicos (JF38 e JF43) apresentaram atividade frente ao *S. mansoni*, destacando que JF43 apresentou atividades para vermes jovens e adultos. As tiossemicarbazonas utilizadas no estudo de Santiago *et al.* não apresentaram atividade frente ao parasito, contudo, as tiossemicarbazonas da série JF-LqIT utilizadas em presente trabalho foram o grupo com o maior número de compostos ativos (três tiossemicarbazonas – JF30, JF31 e JF34), apresentando índices de mortalidade em diferentes concentrações (50µM, 100µM e 200µM) e em diferentes tempos (24h, 48h e 120h).

As análises das imagens obtidas por microscopias eletrônicas de varredura neste estudo, evidenciaram que os compostos JF31 (tiossemicarbazona) e JF43 (tiazolidina) causaram danos ultraestruturais no tegumento dos parasitos machos e fêmeas, nas fases jovens e adultos. Resultados semelhantes, foram encontrados por Silva *et al.* (2014) que perceberam destruição de espículas e tubérculos, exposição de musculatura e morfologia contorcida em vermes adultos de *S. mansoni* tratados com derivados imidazolidínicos na dose de 60µg/mL em 24h de tratamento. Alterações similares em adultos de *S. mansoni*, também foram descritas por Santiago *et al.* (2015), quando submetido ao tratamento com o tiazol, composto LpQM-45, na concentração de 80µg/mL, em 24h de tratamento. Estudos realizados por Mariz Gomes da Silva *et al.* (2018) observaram que o composto 1,3-benzodioxole apresentou ação contra vermes adultos de *S. mansoni*, desencadeando alterações no tegumento do verme, na concentração de 100µg/mL, por 24h. Dessa forma, pode-se inferir que compostos que tenham como alvo o tegumento, são eficazes na destruição do parasito de forma direta, levando a sua morte, como também, de forma indireta expondo o verme a ação do sistema imune do hospedeiro.

A eficácia dos compostos, tiazolidinas JF38 e JF43, deve-se ao fato de compartilharem substituintes com três átomos de Flúor (F). O F é um halogênio bastante utilizado em ensaios de atividade biológica e tem sido descrito como elemento que tem capacidade de aumentar a absorção dos compostos pela membrana celular (Thomas, 2003). No presente estudo, o composto JF43 contendo o substituinte trifluorometóxi, foi responsável por alterações

ultraestruturais significativas na topografia dos vermes jovens e adultos, podendo-se inferir, que essas alterações estejam relacionadas a uma maior absorção e interação dessa molécula no tegumento dos vermes.

Estudos de Silva *et al.* (2018) observaram que ao tratar com o 1,3-benzodioxole na dose de 200 μ M, em 72h atingia 100% de mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni*. Os achados corroboram com os resultados acima, onde percebeu-se que a dose de 200 μ M para os compostos JF31 e JF43 foi a que apresentou no menor espaço de tempo, 24h para vermes adultos e 48h para vermes jovens, atividade frente aos parasitos.

Nas concentrações que apresentaram atividade esquistossomicida os vermes fêmeas e machos apresentavam-se com morfologia contorcida. Tais resultados assemelham-se aos achados de Vale *et al.* 2017, que demonstraram que vermes tratados com PZQ se apresentam contorcidos e enovelados uma vez que o PZQ tem ação nos canais de Ca²⁺, sugerindo que os compostos JF31 e JF43 podem agir também neste mecanismo celular.

Estudos *in vitro* sobre a atividade de compostos e moléculas em formas juvenis de *S. mansoni* são escassos e sem abrangência de investigação. Contudo, estudos *in vivo* de Fernandes *et al.* (2017), ao testar a ação de extratos hexânicos e etanólicos de *Phyllanthus amarus* em camundongos com 30 e 45 dias após a infecção, perceberam a redução no número total de vermes presentes nos dois tempos, corroborando com os nossos resultados que demonstraram a susceptibilidade das formas jovens e adultas aos compostos JF31 e JF43 em parasitos com 30 e 50 dias de vida. Estudos de Oliveira *et al.* (2014), perceberam que o tratamento *in vivo* com extratos de *Baccharis trimera* em camundongos com 30 dias de infectados apresentaram a redução de 75% e 68%, enquanto o PZQ apenas obteve redução de 37%, resultados afins aos nossos estudos *in vitro*, onde o PZQ se apresentou 75% eficaz frente as formas jovens e os compostos JF31 e JF43 apresentaram índices de 100% de mortalidade.

Estudos de Oliveira *et al.* (2018) quando testaram derivados do composto LpQM-45 (tiazol) descrito por Santiago *et al.* (2014), perceberam ação esquistossomicida em esquistossômulos dos derivados 7a e 7h em 48h. Mesmo o esquistossômulo tendo características distintas dos vermes com 30 dias, os achados corroboram com os nossos resultados, onde a forma juvenil de *S. mansoni* quando tratada com as moléculas JF31 e JF43, apresentaram 100% de mortalidade no mesmo período, sugerindo assim futuras investigações sobre a eficácia das tiossemicarbazonas e tiazolidinas frente a esquistossômulos.

No que concerne a citotoxicidade, a bibliografia sobre a ação de tiossemicarbazonas e tiazolidinas sobre células VERO é escassa. Braga *et al.* (2016) descreveram a citotoxicidade de tiossemicarbazonas em células VERO, onde a CC₅₀ dos compostos analisados foi maior

que 100 μ M, corroborando com os nossos resultados, onde tiosemicarbazonas apresentaram CC₅₀ que variavam de 271,50 a 724,13 μ M. Contudo, a citotoxicidade não pode ser observada como um único parâmetro para a confiabilidade dos compostos. Segundo Oliveira *et al.* (2017), os estudos *in vitro* são importantes, porém, a citotoxicidade *in vivo* pode ser diferente do apresentado anteriormente, necessitando assim que sejam feitos estudos complementares para averiguar sua citotoxicidade diretamente em modelos experimentais *in vivo*.

Ao final dos estudos, os compostos JF31 e JF43 apresentaram-se como os mais promissores da série JF-LqIT/UFPE uma vez que apresentaram atividade esquistossomicida sob formas juvenis e adultas de *S. mansoni* em concentrações mais baixas que as CC₅₀ determinadas para células VERO. Melhorias podem ser empregadas nos compostos a fim de que se tornem solúveis em água, garantindo assim uma maior segurança em testes *in vivo* destes candidatos a futuros fármacos anti-helmínticos.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, ao Instituto Aggeu Magalhães e a CAPES.

Referências

- Aires ADL, Ximenes ECPA, Barbosa VX, Góes AJDS, Souza VMO, Albuquerque MCPDA 2014. β -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. *Phytomedicine* 21: 261–267.
- Bertão HG, Silva RAR Da, Padilha RJR, Azevedo Albuquerque MCP De, Rádis-Baptista G 2012. Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. *Parasitol. Res.* 110: 2465–2473.
- Braga SFP, Fonseca NC, Ramos JP, Souza-Fagundes EM de, Oliveira RB de 2016. Synthesis and cytotoxicity evaluation of thiosemicarbazones and their thiazole derivatives. *Brazilian J. Pharm. Sci.* 52: 299–307.
- Colley DG, Bustinduy AL, Secor WE, King CH 2014. Human schistosomiasis. *Lancet* 383: 2253–2264.
- Espíndola JWP, Oliveira Cardoso MV De, Oliveira Filho GB De, Oliveira E Silva DA, Moreira DRM, Bastos TM, Simone CA De, Soares MBP, Villela FS, Ferreira RS, Castro MCAB De, Pereira VRA, Murta SMF, Sales Junior PA, Romanha AJ, Leite ACL 2015. Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxyl thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. *Eur. J. Med. Chem.* 101: 818–835.
- Espíndola JWP, Oliveira Cardoso MV De, Oliveira Filho GB De, Oliveira E Silva DA, Moreira DRM, Bastos TM, Simone CA De, Soares MBP, Villela FS, Ferreira RS, Castro

- MCAB De, Pereira VRA, Murta SMF, Sales Junior PA, Romanha AJ, Leite ACL 2015. Synthesis and structure-activity relationship study of a new series of antiparasitic aryloxy thiosemicarbazones inhibiting *Trypanosoma cruzi* cruzain. *Eur. J. Med. Chem.* 101: 818–835.
- Farias Santiago E De, Oliveira SA De, Oliveira Filho GB De, Magalhaes Moreira DR, Teixeira Gomes PA, Silva AL Da, Barros AF De, Silva AC Da, Ramos Dos Santos TA, Alves Pereira VR, Araújo Gonçalves GG, Brayner FA, Alves LC, Wanderley AG, Lima Leite AC 2014. Evaluation of the anti-*Schistosoma mansoni* activity of thiosemicarbazones and thiazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* 58: 352–363.
- Graser-Loescher G, Schoenhuber A, Ciglenec C, Eberl S, Krupitza G, Mader RM, Jadav SS, Jayaprakash V, Fritzer-Szekeres M, Szekeres T, Saiko P 2017. Thiosemicarbazone derivatives, thiazolyl hydrazones, effectively inhibit leukemic tumor cell growth: Down-regulation of ribonucleotide reductase activity and synergism with arabinofuranosylcytosine. *Food Chem. Toxicol.* 108: 53–62.
- Guimarães MA, Oliveira RN de, Vêras LMC, Lima DF, Campelo YDM, Campos SA, Kuckelhaus SAS, Pinto PLS, Eaton P, Mafud AC, Mascarenhas YP, Allegretti SM, Moraes J de, Lolić A, Verbić T, Leite JRSA 2015. Anthelmintic Activity In Vivo of Epiisopiloturine against Juvenile and Adult Worms of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9: e0003656.
- Hussein A, Rashed S, Hayawan I El, El-sayed R, Ali H 2017. *Curcuma longa*). 12: 587–596.
- Mariz Gomes da Silva LM, Oliveira JF de, Silva WL, Silva AL da, Almeida Junior ASA de, Barbosa dos Santos VH, Alves LC, Brayner dos Santos FA, Costa VMA, Aires A de L, Lima M do CA de, Albuquerque MCP de A 2018. New 1,3-benzodioxole derivatives: Synthesis, evaluation of in vitro schistosomicidal activity and ultrastructural analysis. *Chem. Biol. Interact.* 283: 20–29.
- Matos-Rocha TJ, Cavalcanti MG dos S, Veras DL, Feitosa APS, Gonçalves GGA, Portela-Junior NC, Lúcio ASSC, Silva AL da, Padilha RJR, Marques MOM, Barbosa-Filho JM, Alves LC, Brayner FA 2016. Ultrastructural changes in *Schistosoma mansoni* male worms after in vitro incubation with the essential oil of *Mentha x villosa* Huds. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 58: 2–7.
- Matos-Rocha TJ, Lima MDCA de, Silva AL da, Oliveira JF de, Gouveia ALA, Silva VBR da, Almeida Júnior ASA de, Brayner FA, Cardoso PRG, Pitta-Galdino M da R, Pitta I da R, Melo Rêgo MJB de, Alves LC, Rocha Pitta MG da 2017. Synthesis and biological evaluation of novel imidazolidine derivatives as candidates to schistosomicidal agents. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 59: 1–10.
- Mosmann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65: 55–63.
- Oliveira JF de, Lima TS, Vendramini-Costa DB, Lacerda Pedrosa SCB de, Lafayette EA, Silva RMF da, Almeida SMV de, Moura RO de, Ruiz ALTG, Carvalho JE de, Lima M do CA de 2017. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives:

Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. *Eur. J. Med. Chem.* 136: 305–314.

Oliveira JF De, Silva AL Da, Vendramini-Costa DB, Cruz Amorim CA Da, Campos JF, Ribeiro AG, Moura RO De, Neves JL, Ruiz ALTG, Carvalho JE De, Alves De Lima MDC 2015. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. *Eur. J. Med. Chem.* 104: 148–156.

Oliveira RN de, Rehder VLG, Oliveira ASS, Jeraldo V de LS, Linhares AX, Allegretti SM 2014. Anthelmintic activity in vitro and in vivo of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Exp. Parasitol.* 139: 63–72.

Oliveira SA de, Oliveira Barbosa M de, Filho CALM, Oliveira AR, Sousa FA de, Farias Santiago E de, Oliveira Filho GB de, Moraes Gomes PAT de, Conceição JM da, Brayner FA, Alves LC, Leite ACL 2018. Phthalimido-thiazole as privileged scaffold: activity against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol. Res.*: 1–11.

Ramirez B, Bickle Q, Yousif F, Fakorede F, Mouries M-A, Nwaka S 2007. Schistosomes: challenges in compound screening. *Expert Opin. Drug Discov.* 2: S53–S61.

Silva A, Oliveira S, Oliveira J, Santiago E, Júnior A, Jacobi Í, Peixoto C, Rocha V, Soares M, Pitta I, Lima M 2014. Tegumental Changes in Adult *Schistosoma mansoni* Induced by a New Imidazolidinic Derivative. *Br. J. Pharm. Res.* 4: 1988–2005.

Thomas G. *Medicinal chemistry: an introduction*. Ed. Guanabara Koogan. 2003

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As moléculas JF31 e JF43 da série JF (LqIT/UFPE) mostraram-se com potencial para prosseguir nos testes biológicos a fim de tornar-se um possível tratamento futuro para a esquistossomose por apresentar uma boa ação em vermes jovens e adultos de *S. mansoni*;
- A série apresentou diferentes níveis de citotoxicidade, porém atividade esquistossomicida ocorreu em índices abaixo da CC₅₀;
- Os compostos agiram fortemente sobre o tegumento dos vermes jovens e adultos provocando alterações ultraestruturais;
- Avaliações *in vivo* poderão corroborar o potencial esquistossomicida dos compostos da série JF (LqIT/UFPE) avaliados *in vitro*.

REFERÊNCIAS

- AIRES, A. D. L. et al. β -Lapachone: A naphthoquinone with promising antischistosomal properties in mice. **Phytomedicine**, v. 21, n. 3, p. 261–267, 2014.
- ASATI, V.; MAHAPATRA, D. K.; BHARTI, S. K. Thiazolidine-2,4-diones as multi-targeted scaffold in medicinal chemistry: Potential anticancer agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 87, p. 814–833, 2014.
- BARROS, C. D. et al. Synthesis and anti-inflammatory activity of new arylidene-thiazolidine-2,4-diones as PPAR γ ligands. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 11, p. 3805–3811, 2010.
- BERTÃO, H. G. et al. Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Parasitology Research**, v. 110, n. 6, p. 2465–2473, 2012.
- BOZDAG-DÜNDAR, O. et al. Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazolyl thiazolidine-2, 4-dione derivatives pp 6012–6017. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 15, n. 18, 2007.
- CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: Praziquantel forever? **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23–29, 2014. COLLEY, D. G. et al. Human schistosomiasis. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2253–2264, 2014.
- CZUBATKA-BIEŃKOWSKA, 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.
- DE ARAÚJO NETO, L. N. et al. Synthesis, cytotoxicity and antifungal activity of 5-nitro-thiophene-thiosemicarbazones derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, v. 272, p. 172–181, 2017.
- DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: Mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 659–667, 2008.
- EGESA, M. et al. Rethinking Schistosomiasis Vaccine Development: Synthetic Vesicles. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 12, p. 918–921, 2017.
- 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.
- ESPÍRITO-SANTO, M. C. C. et al. Comparative Study of the Accuracy of Different Techniques for the Laboratory Diagnosis of Schistosomiasis Mansoni in Areas of Low Endemicity in Barra Mansa City, Rio de Janeiro State, Brazil. **BioMed research international**, v. 2015, p. 135689, 2015.
- FALLON, P. G. et al. Schistosome resistance to praziquantel: Fact or artifact? **Parasitology Today**, v. 12, n. 8, p. 316–320, 1996.

- GRASER-LOESCHER, G. et al. Thiosemicarbazone derivatives, thiazolyl hydrazones, effectively inhibit leukemic tumor cell growth: Down-regulation of ribonucleotide reductase activity and synergism with arabinofuranosylcytosine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 108, p. 53–62, 2017.
- HARDER, A.; ANDREWS, P.; THOMAS, H. Praziquantel: mode of action. **Biochemical Society transactions**, v. 15, n. 1, p. 68–70, 1987.
- HESS, J.; KEISER, J.; GASSER, G. Toward organometallic antischistosomal drug candidates. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 821–830, 2015.
- 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
- KEISER, J. et al. In vitro and in vivo antischistosomal activity of ferroquine derivatives. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2014.
- LEITE, N.M.S. et al. Síntese, elucidação estrutural e avaliação da atividade antiinflamatória de novas 2-imino-tiazolidin-4-onas. **Dissertação (Dissertação em Ciências Farmacêuticas) – UFPE**. Recife, p. 90. 2016.
- LIMA, R. N. et al. Combined treatment of *Biomphalaria glabrata* infected by *Schistosoma mansoni* with oxamniquine and praziquantel: Reproductive histological and metabolic aspects. **Experimental Parasitology**, v. 183, p. 6–12, 2017.
- LIU, J. et al. Novel inhibitors of tyrosinase produced by the 4-substitution of TCT (II). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 1096–1106, 2017.
- LOTFY, W. M. et al. Evaluation of a method for induction of praziquantel resistance in *Schistosoma mansoni*. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 8, p. 1214–1219, 2015.
- MARIZ GOMES DA SILVA, L. M. et al. New 1,3-benzodioxole derivatives: Synthesis, evaluation of in vitro schistosomicidal activity and ultrastructural analysis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, n. December 2017, p. 20–29, 2018.
- MATOS-ROCHA, T. J. et al. Synthesis and biological evaluation of novel imidazolidine derivatives as candidates to schistosomicidal agents. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 59, n. September 2016, p. 1–10, 2017.
- MATOS-ROCHA, T. J. et al. Ultrastructural changes in *Schistosoma mansoni* male worms after in vitro incubation with the essential oil of *Mentha x villosa* Huds. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. 2, p. 2–7, 2016.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983.
- NEVES, D. P. **Parasitologia Dinâmica**. 1 ed. São Paulo: Atheneu, 2003.
- NEVES, D. P.; MELO, A. L.; LINARDI, P. M. **Parasitologia humana**. 12. ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2011.

- OLIVEIRA, J. F. et al. Evaluation of anti-inflammatory effect of derivative (E)-N-(4-bromophenyl)-2-(thiophen-2-ylmethylene)-thiosemicarbazone. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 80, p. 388–392, 2016.
- OLIVEIRA, J. F. et al. Synthesis of thiophene-thiosemicarbazone derivatives and evaluation of their in vitro and in vivo antitumor activities. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 104, p. 148–156, 2015.
- OLIVEIRA, J. F. et al. Thiosemicarbazones and 4-thiazolidinones indole-based derivatives: Synthesis, evaluation of antiproliferative activity, cell death mechanisms and topoisomerase inhibition assay. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 136, p. 305–314, 2017.
- 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.
- PELIVAN, K. et al. Differences in protein binding and excretion of Triapine and its Fe(III) complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 160, p. 61–69, 2016.
- PENG, Z.; CHANG, C. **Medicinal Chemistry**. v. 9, p. 533–536, 2017.
- 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.
- SANTINI-OLIVEIRA, M. et al. Schistosomiasis vaccine candidate Sm14/GLA-SE: Phase 1 safety and immunogenicity clinical trial in healthy, male adults. **Vaccine**, v. 34, n. 4, p. 586–594, 2016.
- SCHVER, G. C. R. M. et al. Solid dispersions to enhance the delivery of a potential drug candidate LPSF/FZ4 for the treatment of schistosomiasis. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 115, n. 2017, p. 270–285, 2018.
- SILVA, A. L. et al. In vivo study of schistosomicidal action of 1-benzyl-4-[(4-fluoro-phenyl)-hydrazono]-5-thioxo-imidazolidin-2-one. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 83, p. 502–507, 2016.
- 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.
- 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.

ANEXO A – PARECER DO CEUA



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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: “**AValiação da Atividade Esquistossomicida e Análise Ultraestrutural de Novos Compostos Sintéticos Frente ao *Schistosoma mansoni***” protocolado sob nº **104/2016** pelo (a) pesquisador (a) Dr Luiz Carlos Alves está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 07/12/2016. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 07 de dezembro de 2020 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo
Camundongo heterogênico (Swiss Webster)	380 (30 gr/ 25 dias/ machos e fêmeas)
TOTAL	380

We certify that project “**AValiação da Atividade Esquistossomicida e Análise Ultraestrutural de Novos Compostos Sintéticos Frente ao *Schistosoma mansoni***” (CEUA Protocol nº 104/2016) coordinated by **LUIZ CARLOS ALVES** is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz on december, 07, 2016. In present version this project is licensed and valid until december 2020 . for the purpose of scientific research. These animals come from the Bio-establishment of the Aggeu Magalhães / Fiocruz-PE Research Center.

Recife (PE, BRAZIL) June, 20, 2017

Lindomar José Pena
 Coordenador da CEUA/IAM (Fiocruz Pernambuco)
 Lindomar José Pena
 Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
 Mat. Sia.pe: 1971435
 e-mail: Lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br
 IAM / Fiocruz

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