

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**POTENCIAL TERAPÊUTICO DE NOVOS FÁRMACOS NA
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA**

ANEKÉCIA LAURO DA SILVA

RECIFE – 2010

ANEKÉCIA LAURO DA SILVA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas área de concentração Farmacologia, Fisiologia e Química Medicinal.

ORIENTADORA

Prof^ª. Dr^ª. Suely Lins Galdino

CO-ORIENTADORA

Prof^ª. Dr^ª. Sheilla Andrade de Oliveira

RECIFE – 2010

Silva, Anekécia Lauro da

Potencial terapêutico de novos fármacos na avaliação da atividade esquistossomicida / Anekécia Lauro da Silva. – Recife: O Autor, 2010.

106 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Suely Lins Galdino

Co-Orientadora: Sheilla Andrade de Oliveira

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.
Centro de Ciências Biológicas. Farmacologia, Fisiologia e Química
Medicinal 2010.

Inclui bibliografia

1. Esquistossomose 2. Quimioterapia 3. Farmacologia I. Título.

616.963

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-115

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

REITOR

Prof. Dr. Amaro Henrique Pessoa Lins

VICE-REITOR

Prof. Dr. Gilson Edmar Gonçalves e Silva

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Dr. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr. Ângela Maria Isidoro de Farias

VICE-DIRETORA DO CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Prof^a. Dr. Sílvia Regina Arruda de Moraes

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS**

Prof^a. Dr. Maria Tereza dos Santos Correia

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Prof^a. Dr. Suely Lins Galdino

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

Parecer da comissão examinadora da dissertação de:
Anelécia Lauro da Silva

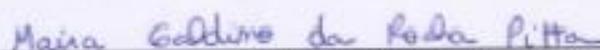
Instituída:
Potencial terapêutico de novos fármacos na avaliação da atividade esquistossomocida

A comissão examinadora considera o presente trabalho
APROVADO POR UNANIMIDADE

Portanto, cumpridas todas as exigências regimentais, Anelécia Lauro da Silva faz jus ao
grau de Mestre em Ciências Biológicas pela UFPE, Recife, 30/07/2010.



Orientador: Dra. Sady Lins Galdino
Departamento de Antibióticos, UFPE



Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta
Departamento de Bioquímica, UFPE



Co-orientador: Dra. Sheilla Andrade de Oliveira
Departamento de Imunologia, CPqAM/FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, a Professora Suely Lins Galdino, pela orientação, dedicação, incentivo, colaboração e confiança na realização deste trabalho.

A minha co-orientadora, a Professora Sheilla Andrade de Oliveira pela co-orientação, dedicação, paciência, esforço e pelas palavras de estímulo e perseverança durante o desenvolvimento dessa dissertação.

Aos meus colaboradores, o Professor Ivan da Rocha Pitta, a Professora Valéria Rêgo, a Professora Teresinha Gonçalves, a Professora Ivone Souza, a mestre Andréa Ferreira de Barros e em especial, a Professora Maria do Carmo Alves de Lima, que me recebeu no laboratório desde a iniciação científica como minha orientadora, contribuindo para o meu crescimento acadêmico, profissional e pessoal.

A minha amiga Fabiana Oliveira que esteve comigo desde a graduação, seleção do mestrado e até o presente momento, por demonstrar tamanha amizade, companheirismo, enorme paciência, dedicação e nunca desistir de mim estando presente em todos os momentos durante esses dois anos de dedicação.

Aos meus pais, meus irmãos, minha avó e minhas cunhadas por entender a minha ausência, acreditar em mim e contribuir perseverando para que eu alcançasse o meu objetivo.

A todos que fazem parte do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães Andréia Barros, Laís Amorim, Ronny Evêncio, Veruska Cíntia, Mineo e Roberto.

A todos que fazem parte do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos Juliana Cruz, Juliana Kelly, Juliana Dantas, Thiago Lins, Albert, Nathália Colaço, Sandra Botelho, Sandra Alcantara, Andreza Tavares, Michelle France, Willams leal, Tiago Bento, Diana Malta, Antônio Sergio, Aracelly França, João Paulo, Amanda, Bárbara, Beatriz, Leidane, Giselle, Marina Pitta, Jamerson, Sybelle Lacerda, Felipe Freitas, Talita, Pedro, Camila, Thiago Aquino, Cleiton Diniz e Luiz Carlos

Aos todos os meus grandes amigos de Vitória de Santo Antão, em especial, Diana Lupercínio, Raquely Alves, Luana Moreira, Rafaely Alves, Gemilton Freitas, Marielle Marinho, Valdemir Lino e Tiago Henrique pela forte torcida e compreensão nas minhas horas de tribulações e ausências.

A Adenilda Lima, secretária da pós-graduação pela atenção, por toda torcida, amizade e dedicação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPGCB) da Universidade Federal de Pernambuco.

A FACEPE pelo suporte financeiro.

A Deus, por toda proteção, amor e por ter guiado meus passos permitindo que eu chegasse até aqui.

DEDICO ESTE TRABALHO

A Deus e a minha Família!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	V
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE TABELAS	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	18
2. OBJETIVOS	21
2.1. Gerais	21
2.2. Específicos	21
3. JUSTIFICATIVA.....	23
4. REVISÃO DE LITERATURA	25
4.1. HISTÓRICO	25
4.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA.....	26
4.3. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DOS VERMES ADULTOS DO S. <i>mansoni</i>	29
4.4. CICLO BIOLÓGICO.....	31
4.5. PATOLOGIA.....	33
4.5.1. Forma Aguda	33
4.5.2. Forma Crônica	34
4.6. DIAGNÓSTICO	36
4.7. TRATAMENTO	37
4.7.1. Agentes Esquistossomicidas	39
4.8. RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS.....	47
4.9. PERSPECTIVAS DE NOVOS FÁRMACOS.....	48
4.9.1. Tiazolidinas.....	48
4.10. PERSPECTIVAS DE NOVOS ALVOS BIOLÓGICOS	50
4.10.1. Vias de Sínteses de Purinas	50
4.10.2. Tiorredoxina Glutationa Redutase	51
4.10.3. Proteases Cisteínas.....	52
4.10.4. Metabolismo dos Lipídeos.....	54
4.10.5. Sistema Neuromuscular	55
4.10.6. Proteína Tirosina Quinase (PTK)	56
4.10.7. Canais de Cálcio	56
4.10.8. DNA Topoisomerases.....	57
4.10.9. PPAR γ como Alvo Terapêutico na Fibrose Hepática.....	58

5.	PARTE BIOLÓGICA	61
5.1.	MATERIAL	61
5.2.	MÉTODOS	64
5.2.1.	Infecção.....	64
5.2.2.	Perfusão do sistema porta para contagem da carga parasitária.....	64
5.2.3.	Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> frente aos derivados tiazolidínicos	64
5.2.4.	Avaliação da atividade citotóxica das substâncias obtidas por meio sintético em culturas de células esplênicas	65
5.2.5.	Avaliação da Atividade Tóxica dos Compostos em Células de Camundongos Isogênicos	66
5.2.6.	Preparação da suspensão base para a dispersão sólida em PEG.....	66
5.2.7.	Avaliação da suscetibilidade <i>in vivo</i> de vermes adultos e formas juvenis de <i>Schistosoma mansoni</i> frente aos derivados tiazolidínicos.....	67
5.2.8.	Determinação da eficácia do tratamento.....	67
5.2.9.	Oograma	68
6.	RESULTADOS.....	70
7.	DISCUSSÃO	79
8.	CONCLUSÕES	88
9.	PERSPECTIVAS.....	90
10.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	92

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADME** - adsorção, distribuição, metabolismo e excreção
- BALB/c** - camundongo albino
- CMC** - carboximetil celulose
- DDVP** - 2,2-diclorovinil dimetil fosfato
- DMSO** - dimetilsulfóxido
- DNA** - ácido desoxirribonucleico
- ECM** - matriz extracelular excedente (extracellular matrix)
- F6P** - frutose-6-fosfato
- FDP** - frutose-1,6-difosfato
- GABA** - ácido gama-aminobutírico
- GR** - glutatona redutase
- GSH** - tripeptídeo glutatona
- GSSG** - glutatona dissulfido
- HSC** - células esteladas hepáticas
- IgG** - imunoglobulina tipo G
- IgM** - imunoglobulina tipo M
- K11777** - N-metil-piperazina-fenilalanil-homofenilalanil-vinilsulfona fenilvinil sulfona
- KOH** - hidróxido de potássio
- LDL** - lipoproteína de baixa densidade
- NADPH** - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
- OMS** - Organização Mundial de Saúde
- OXA** - oxaminiquine
- PDGF** - platelet-derived growth factor
- PEG** - polietilenoglicol
- PGE** - prostaglandinas
- Pi** - ortofosfato inorgânico
- PKF** - fosfofrutoquinase (phosphofructokinase)
- PNP** - purina nucleosídeo fosforilase (Purine nucleoside phosphorylase)
- PPAR** - peroxysome proliferator activated receptor
- PTK** - proteína tirosina quinase
- PZQ** - praziquantel

RNA - ácido ribonucléico

SmCB2 - catepsina B em *Schistosoma mansoni*

SmPNP - purina nucleosídeo fosforilase em *S. mansoni*

SNC - sistema nervoso central

TGF- β - transforming growth factor - beta

TGR - tioredoxina glutationa redutase

TK3 - tirosina quinase 3

TK5 - tirosina quinase 5

TNF- α - fator de necrose tumoral - alfa

TRD - treinamento em doenças tropicais (Training in Tropical Diseases)

Trx - tioredoxina

TrxR - tioredoxina redutase

TZD - tiazolidina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global das espécies de <i>Schistosoma</i>	27
Figura 2 - Distribuição da esquistossomose mansoni no Brasil	28
Figura 3 - Casal de <i>S. mansoni</i> em cópula com a fêmea alojada no canal ginecofórico do macho	29
Figura 4 - Vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	30
Figura 5 - Ovo maduro de <i>S. mansoni</i>	31
Figura 6 - Ciclo de vida da esquistossomose mansoni	32
Figura 7 - Imagem de fígado infectado pelo <i>S. mansoni</i>	34
Figura 8 - Granuloma hepático da fase crônica com predomínio de tecido fibroso	35
Figura 9 - Paciente com hepatoesplenomegalia	35
Figura 10 - Anel da tiazolidina	48
Figura 11 - Vias redox em mamíferos e em <i>S. mansoni</i>	52
Figura 12 - Vermes do <i>S. mansoni</i> tratados com o inibidor K11777 apresentando retardo do seu crescimento e vermes controle não tratados	53
Figura 13 - 9-Acridanona-hidrazona	58
Figura 14 - Gráfico do LPSF/SF-22	71
Figura 15 - Gráfico do LPSF/SF-25	72
Figura 16 - Gráfico do praziquantel	72
Figura 17 - Gráfico do LSPF/SF-03	73
Figura 18 - Gráfico do LPSF/SF-05	73
Figura 19 - Gráfico de cinética do LPSF/SF-20	74
Figura 20 - Oograma LPSF/SF-25 (25mg/Kg e 200mg/Kg)	78
Figura 21 - Oograma PZQ (25mg/Kg e 200mg/Kg)	78
Figura 22 - Oograma veículo + PEG	78
Figura 23 - Estrutura química do 3-Metil-5-[(4-nitrofenil)azo] rodanina	79
Figura 24 - a) 5-Benzilideno-3-(4-nitro-benzil)-(4-metóxi)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-25); b) Lumefantrina	81
Figura 25 - a) 3-(4-Cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-Diona; b) LPSF/SF-22	82
Figura 26 - Mecanismo de ação do R-NO ₂	83
Figura 27 - a) LPSF/SF-20; b) 3-Benzil-1-metil-5-(4-metil-benzilideno)-	

2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/JT-63)	84
Figura 28 - a) LPSF/SF-05; b) 3-Benzil-1-metil-5-(4-metoxi-benzilideno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/JT-68)	85
Figura 29 - a) LPSF/SF-03; b) 5-(4-bromo-benzilideno)-3-(4-cloro-fenacil)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-140)	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Agentes Esquistossomicidas	46
Tabela 02 - Resultados da citotoxicidade e da IC ₅₀	70
Tabela 03 - Taxa de motilidade dos vermes adultos do <i>S. mansoni</i> (LPSF/SF-22)	75
Tabela 04 - Taxa de motilidade dos vermes adultos do <i>S. mansoni</i> (LPSF/SF-25)	75
Tabela 05 - Taxa de motilidade dos vermes adultos do <i>S. mansoni</i> (PZQ)	75
Tabela 06 - Taxa de motilidade dos vermes adultos do <i>S. mansoni</i> (LPSF/SF-03)	75
Tabela 07 - Taxa de motilidade dos vermes adultos do <i>S. mansoni</i> (LPSF/SF-05)	77
Tabela 08 - Taxa de motilidade dos vermes adultos do <i>S. mansoni</i> (LPSF/SF-20)	76
Tabela 09 - Eficácia do tratamento através do número de vermes recuperados	77

RESUMO

A esquistossomose mansoni, considerada um grave problema de saúde pública, é causada por vermes trematódas da espécie *Schistosoma mansoni*. A forma de tratamento dessa parasitose baseia-se principalmente na quimioterapia, onde o fármaco de escolha utilizado atualmente é o praziquantel que se destaca dentre os outros agentes esquistossomicidas por ser eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma*. No entanto, a utilização exclusiva do praziquantel no tratamento da esquistossomose mansoni tem ocasionado a base do desenvolvimento de uma possível resistência dos vermes do *S. mansoni* a esse fármaco, surgindo à necessidade da busca de novos fármacos esquistossomicidas que sirvam como alternativa para o tratamento da parasitose. Neste contexto, estudos vêm destacando os derivados tiazolidínicos como potenciais esquistossomicidas através da citotoxicidade e da avaliação da susceptibilidade de vermes adultos do *S. mansoni* mantidos *in vitro* e *in vivo*. Neste trabalho, testamos a atividade esquistossomicida dos derivados tiazolidínicos LPSF/SF-03, LPSF/SF-05, LPSF/SF-20 e LPSF/SF-22 e LPSF/SF-25 em diferentes concentrações (100µg/mL, 80µg/mL, 60µg/mL e 40µg/mL). O praziquantel foi utilizado como o fármaco controle. Observamos que os compostos LPSF/SF-22 e o LPSF/SF-25 apresentaram melhor atividade *in vitro* frente aos vermes adultos do *Schistosoma mansoni* na dose de 80µg/mL com uma taxa de mortalidade de 70% e 86%, respectivamente. Nos ensaios de citotoxicidade, o derivado tiazolidínico LPSF/SF-25 apresentou uma melhor concentração atóxica quando comparados aos outros derivados tiazolidínicos testados. Visto aos resultados obtidos *in vitro* com o composto LPSF/SF-25, este derivado foi testado *in vivo*, apresentando uma redução de 28% do número de vermes adultos do *S. mansoni* e alterações nos estádios evolutivos dos ovos dos parasitos. Dessa forma, sugere-se que o derivado tiazolidínico LPSF/SF-25 pode ser considerado um potencial candidato a fármaco esquistossomicida.

Palavras-chaves: esquistossomose mansônica, tiazolidinas, quimioterapia

ABSTRACT

Intestinal schistosomiasis, considered a grave problem to public health, is caused by trematode worm from the *Schistosoma mansoni* species. The form of treatment for this parasite base itself mainly on chemotherapy, where the current drug used is praziquantel, which highlights itself among other antischistosomal agents for being more effective against all *Schistosoma* species, for having lesser costs, and for presenting less side effects to the infected individual. However, the exclusive use of praziquantel in the treatment of intestinal schistosomiasis has provided the base for a possible resistance of the *Schistosoma mansoni* worm to such drug, bringing up the necessity of new antischistosomal drugs that can work as an alternative to the treatment of such parasitosis. In this context, studies have highlighted thiazolidines derivatives as a nucleus of antischistosomal potentiality through the cytotoxicity and the evaluation of the susceptibility of adult *Schistosoma mansoni* worms kept *in vitro* and *in vivo*. In this work, we are using the thiazolidines derivatives LPSF/SF-03, LPSF/SF-05, LPSF/SF-20 and LPSF/SF-22 and LPSF/SF-25. The praziquantel was the experiment's control drug. Different concentrations of thiazolidines derivative were tested (100µg/mL, 80µg/mL, 60µg/mL e 40µg/mL). As results, the LPSF/SF-22 and the LPSF/SF-25 compounds showed better activity *in vitro*, with a mortality rate of 70% and 86% in relation to *Schistosoma mansoni* adult worms in the 80µg/mL dosage. In the cytotoxicity tests, the thiazolidine derivative LPSF/SF-25 showed a better cytotoxicity when compared to the other tested thiazolidines derivatives. Since the results obtained, the LPSF/SF-25 was the thiazolidine derivative tested *in vivo*, showing a 28% reduction in the number of the adult *Schistosoma mansoni* worms, and alterations in the evolutionary stages of the parasites' eggs. In this way, it is suggested that the thiazolidine derivative LPSF/SF-25 can be considered as possible candidates of the antischistosomal drugs.

Key-words: intestinal schistosomiasis, thiazolidines chemotherapy.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é considerada um grave problema de saúde pública e acomete, aproximadamente, 207 milhões de pessoas no mundo inteiro (WHO, 2010). É uma doença parasitária e infecciosa causada por vermes trematódas do gênero *Schistosoma* (BRASIL, 2005). As principais espécies de *Schistosoma* causadoras da parasitose em humanos são: *Schistosoma mansoni*, *S. japonicum* e *S. haematobium* (CAFFREY, 2007). Dentre as espécies infectantes dos seres humanos, o *Schistosoma mansoni* destaca-se por ser um dos agentes etiológicos mais prevalentes nas regiões tropicais e subtropicais, sendo distribuído por cerca de 54 países com uma estimativa de infecção de mais de 83 milhões de pessoas no mundo (WHO, 2010).

Com o objetivo de reduzir as formas graves da esquistossomose mansoni, medidas terapêuticas vem sendo estudadas em todo mundo. No Brasil, tem-se utilizado a quimioterapia com o intuito de diminuir a morbidade, prevalência e incidência da parasitose nas áreas endêmicas (FILHO & SILVEIRA, 2001). Atualmente, o fármaco mais utilizado é o praziquantel (PZQ), (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino{2,1-a}isoquinolina-4-ona), um derivado pirazinoisoquinolina que se tornou o tratamento de escolha por ser eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma*, ao mesmo tempo em que possui um menor custo e toxicidade em comparação aos outros compostos esquistossomicidas anteriormente utilizados (TALLIMA & RIDI, 2007).

O uso exclusivo do PZQ no tratamento da esquistossomose mansoni tem ocasionado a base do desenvolvimento de uma possível resistência dos vermes do *S. mansoni* a esse fármaco (CIOLI, 2004). Devido a isso, há a necessidade do surgimento de novos agentes esquistossomicidas que possam ser utilizados como alternativa para o tratamento desta parasitose (OLIVEIRA, 2008).

Baseado na necessidade da busca de novas medidas terapêuticas surge o desenvolvimento crescente da Química Medicinal que tem por finalidade obter novos quimioterápicos que apresentem uma maior seletividade ao agente invasor ao mesmo tempo em que proporcione uma menor toxicidade ao hospedeiro (OLIVEIRA, 2008).

As imidazolidinas são compostos bioativos e vem se destacando pela sua ampla ação biológica no tocante a propriedades antimicrobianas, anticonvulsivante (OLIVEIRA, 2008), antihipertensiva (AMEMIYA, 1992), antineoplásica (PENG, MARQUEZ & DRISCOLL, 1975) e esquistossomicidas (OLIVEIRA, 2008).

O Grupo de Pesquisa em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco (GPIT/ UFPE) verificou as propriedades esquistossomicidas dos derivados

imidazolidínicos em estudos *in vitro* com vermes adultos do *Schistosoma mansoni* (OLIVEIRA, 2004 & ALBUQUERQUE, 2005). Além das imidazolidinas, outros compostos que tem sido estudados pelo mesmo grupo de pesquisa são os compostos tiazolidínicos, que são derivados heterocíclicos isósteros das imidazolidinas e, também, possuem várias propriedades biológicas, tais como atividade anticonvulsivante, hipnótica, antihelmíntica, antibacteriana, anticancerígena, anti-fúngica, antihistamínica, antiviral, antiinflamatória (VERMA & SARAF, 2008), anti-fibrótica (KON, 2002), anti-diabética, anti-arterosclerose (PERGAL, 2005), antimicrobiana (BOZDAG-DUNGAR, 2007), e antiprotozoária (LIESEN, 2008).

Dessa forma, como alternativa inovadora e sendo as tiazolidinas bioisósteros das imidazolidinas, surge a necessidade da realização de pesquisas e estudos experimentais a fim de avaliar a atividade das tiazolidinas como moléculas candidatas a novos agentes terapêuticos esquistossomicidas.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. Gerais

- Verificar o potencial terapêutico de novas moléculas tiazolidínicas candidatas a fármacos esquistossomicidas.

2.2. Específicos

- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de vermes adultos de *S. mansoni* frente a novos derivados tiazolidínicos sintéticos;
- Analisar em culturas de células esplênicas de camundongos a citotoxicidade das substâncias obtidas por meio sintético;
- Verificar a suscetibilidade *in vivo* de vermes adultos e formas juvenis de *S. mansoni* frente ao derivado tiazolidínico LPSF/SF-25;
- Determinar, através de contagem de vermes e ovos, a carga parasitária dos animais submetidos à terapia com o derivado tiazolidínico LPSF/SF-25.

Justificativa

3. JUSTIFICATIVA

Sendo a esquistossomose considerada um grave problema de saúde pública, há a necessidade da busca de novas formas de tratamento no combate a esta parasitose. O tratamento mais evidenciado é representado pela quimioterapia, apesar da mesma está atualmente, no seu ponto crucial em busca de novos fármacos devido à falta de quimioterápicos eficientes e principalmente por causa do aparecimento de uma possível resistência das cepas do *Schistosoma* ao único fármaco utilizado atualmente, o praziquantel.

Um dos maiores problemas relacionado a essa escassez de novos fármacos esquistossomicidas está diretamente relacionado à falta de incentivos mundiais no setor da saúde e em outros setores envolvidos. Esse descaso se deve ao fato de ser essa doença uma parasitose encontrada principalmente nos trópicos, sendo distribuídas quase que exclusivamente pelos países subtropicais em desenvolvimento onde a pobreza e a falta de saneamento básico ainda fazem parte do cenário social.

Dessa forma, surge a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos mais seguros e eficientes no tratamento da parasitose, possuindo ao mesmo tempo, uma menor taxa de efeitos colaterais e um menor custo, tornando-se acessível ao maior público infectado. Portanto, baseando-se nessa necessidade, o Grupo de Pesquisa do Laboratório de Síntese e Planejamento de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco (LPSF/UPFE) junto ao Laboratório de Imunologia e Biologia Celular do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (LIBM/CPqAM) têm desenvolvido pesquisas tornando os compostos tiazolidínicos candidatos a novos fármacos esquistossomicidas.

Revisão da Literatura

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. HISTÓRICO

A esquistossomose humana foi encontrada pela primeira vez em múmias egípcias que datam de mais de cinco mil anos atrás (DEELDER, 1990). A primeira espécie encontrada foi o *Schistosoma haematobium* e foi descrita por Theodor Bilharz ao realizar necrópsia de um paciente no Egito (SIEBOLD, 1852). Novos estudos demonstraram que os ovos do *S. haematobium* possuíam um espículo terminal e podiam ser encontrados no sangue e na urina do indivíduo infectado com a esquistossomose haematóbica (PRATA, 2008).

Em 1902, o médico inglês Patrick Manson ao realizar exames em um paciente que havia morado em várias ilhas das Índias Ocidentais encontrou ovos com espículo lateral nas fezes e ausência de ovos e células de sangue na urina, o que fez Manson sugerir que aqueles ovos poderiam indicar um tipo diferente de bilharziose (MANSON, 1902).

Manson, em 1905, faz uma distinção mais precisa sobre o habitat desses dois tipos de bilharzia, relatando a presença do *Schistosoma haematobium*, responsável por afetar especialmente a bexiga e produzir ovos com espículo terminal e do *Schistosoma mansoni*, uma nova espécie que se caracterizava por atingir o reto e produzir apenas ovos de espículo lateral (MANSON, 1905).

Dois anos mais tarde, Sambon sugeriu a Zoological Society de Londres, a descoberta de uma nova espécie parasitária, onde foi denominada de *Schistosoma mansoni* em homenagem a Manson (SAMBON, 1907a,b). A descrição dessa nova espécie encontrada por Sambon não foi validada logo de imediato, devido ao fato de suas pesquisas e descrições terem sido realizadas com um número pequeno de vermes (KATZ & ALMEIDA, 2003).

A esquistossomose mansônica é uma doença parasitária que foi descrita pela primeira vez na Ásia (ZHANG, 2001). A migração e colonização de descendentes asiáticos para a África foi, provavelmente, o fator responsável pela disseminação da doença nesse continente, com posterior propagação para o Ocidente, devido ao tráfico de escravos que se instaurou nessa mesma época (FILES, 1951; DESPRÈS, 1993).

Em 1908, Pirajá da Silva encontrou no Brasil o primeiro caso de *S. mansoni* ao realizar alguns exames em um indivíduo da Bahia, onde foi possível encontrar ovos com espículo lateral muito semelhante ao de *S. mansoni* (KATZ, 2008). Os estudos de

Sambon foram repetidos e aperfeiçoados pelo pesquisador brasileiro Pirajá da Silva (1908), o qual através de minuciosas observações sobre as características taxonômicas dos vermes encontrados em autópsias humanas e em amostras fecais de indivíduos infectados retirou dúvidas existentes sobre os trabalhos anteriormente realizados (KATZ & ALMEIDA, 2003). Nessa pesquisa, Pirajá, fez um relato completo com descrição da morfologia dos ovos e dos vermes do *S. mansoni* (KATZ, 2008).

Alguns anos após, Robert Leiper (1915) faz a descrição completa do ciclo de vida do *S. hematobium* e do *S. mansoni*, onde ele demonstrou experimentalmente, as diferenças existentes entre as duas espécies (KATZ, 2008). Adolfo Lutz (1916) teve valiosa contribuição nos estudos sobre a esquistossomose mansônica no Brasil. Seus trabalhos tiveram como foco a análise de ovos de *S. mansoni*, das fases larvárias, miracídios, esporocistos, cercárias e a descoberta do molusco *Biomphalaria glabrata* como seu hospedeiro intermediário. Além disso, Lutz fez importantes registros sobre a sintomatologia, patologia, profilaxia e a terapêutica da infecção pelo *S. mansoni* em humanos e em trabalhos experimentais (LUTZ, 1918).

Desde os primeiros anos de ocorrência da parasitose no Brasil até os dias atuais, apenas a esquistossomose mansônica perdurou no mesmo. Isso se deve a presença exclusiva do hospedeiro intermediário do *S. mansoni* no país (KATZ & ALMEIDA, 2003). Devido às imigrações no tempo da colonização, as primeiras áreas que se tornaram endêmicas no Brasil foram a Região Nordeste e o Estado de Minas Gerais. Com o passar do tempo, a parasitose foi se distribuindo geograficamente e, atualmente, há a presença de vários focos isolados no país, consolidando, portanto, a esquistossomose mansônica como um grave problema de saúde pública (KATZ & ALMEIDA, 2003).

4.2. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) indicam que aproximadamente 207 milhões de pessoas estão infectadas pela esquistossomose no mundo. Essa parasitose é considerada uma doença tropical por ser endêmica em 74 países em desenvolvimento encontrados nos trópicos, sendo a segunda doença parasitária que mais acomete indivíduos em todo o mundo, ficando atrás, em número de casos, apenas das infecções por malária (WHO, 2010; NEGHINA, 2009).

A esquistossomose é causada por vermes tremátodos do gênero *Schistosoma*, possuindo diferentes agentes etiológicos responsáveis pela infecção: o *Schistosoma mansoni*, o *S. haematobium*, o *S. japonicum*, o *S. intercalatum* e o *S. mekongi*, sendo as três primeiras espécies as principais responsáveis pela forma clínica. As duas últimas têm sua distribuição geográfica limitada (SILVA, CHIEFFI & CARRILHO, 2005).

A distribuição global da esquistossomose está associada com a presença do hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria* (CALDEIRA, JANNOTTI-PASSOS & CARVALHO, 2009). Estes caramujos podem colonizar uma grande variedade de habitat, desde rios, valas até lagos e pequenos poços e, a escassez de incentivos sanitários com tratamento de água e uma rede de esgoto adequada ajudam na propagação desses moluscos e, conseqüentemente, da parasitose (FILHO & SILVEIRA, 2001).

A esquistossomose mansônica é considerada endêmica, atualmente, em 54 países na América Latina, Caribe, África e Oriente Médio. Porém, um processo migratório dessa parasitose vem acontecendo das regiões infectadas para as áreas da África onde existiam apenas casos de esquistossomose haematóbica (WHO, 2008).

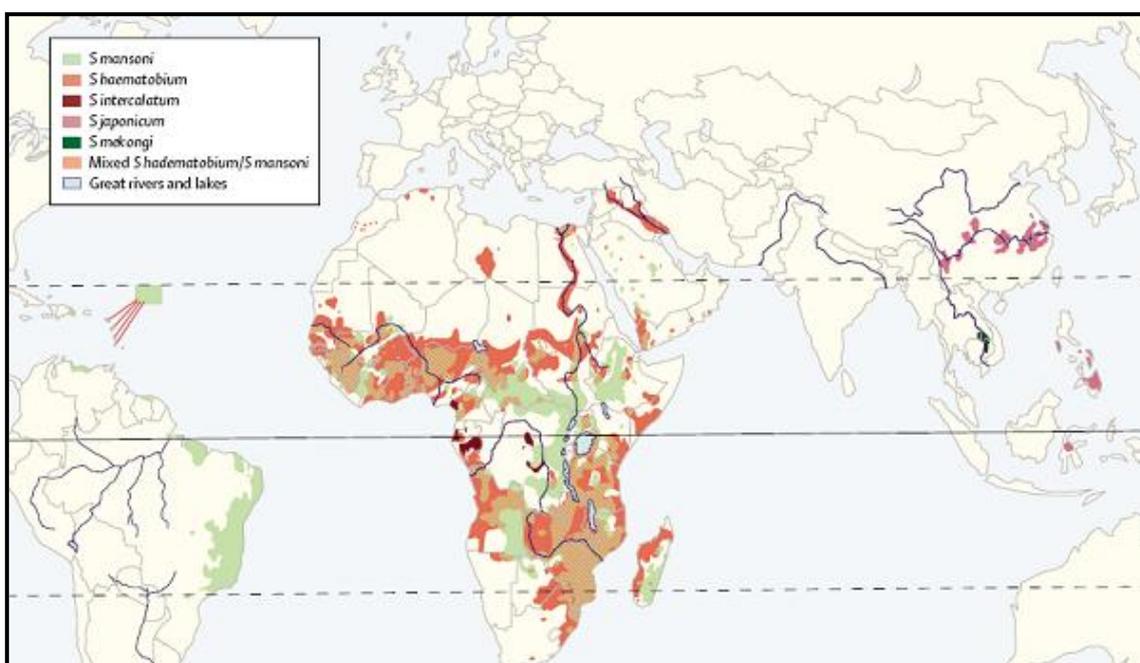


Figura 1: Distribuição global das espécies de *Schistosoma* (GRYSEELS, 2006)

No Brasil, devido à expansão das populações das áreas rurais para a área urbana e a imensa diversidade climática, econômica e social refletindo, conseqüentemente, na imensa variedade de parasitoses encontrada no país, a esquistossomose mansoni se

enquadra em uma das doenças endêmicas mais significativas (SCHNACK, 2003; DOMINGUES & BARRETO, 2001) apresentando um aumento cada vez maior do número de casos de esquistossomose no país (XIMENES, 2001). Estima-se que existam no país a presença de 6 a 8 milhões de pessoas infectadas pelo *S. mansoni*, principalmente nos estados do Nordeste e em Minas Gerais (VRANJAC, 2007; KATZ & ALMEIDA, 2003).

As áreas endêmicas no país abrangem os estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Espírito Santo e Minas Gerais. No estado de Pernambuco, estima-se que exista uma área endêmica para a esquistossomose mansoni equivalente a 17,5% da área total do estado, apresentando, no ano de 2006, 762 casos notificados da parasitose (BRASIL, 2006). Em alguns estados são encontrados focos da doença sendo estes distribuídos pelo Pará, Maranhão, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (VRANJAC, 2007) (figura 2).

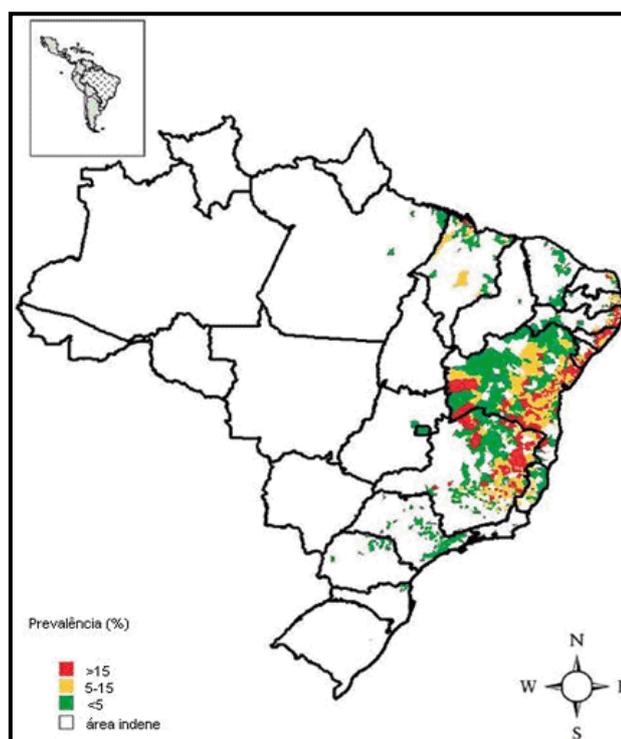


Figura 2: Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil (ENGELS, 2006)

4.3. CARACTERÍSTICAS BIOLÓGICAS DOS VERMES ADULTOS DO *S. mansoni*

Os trematódeos do gênero *Schistosoma* diferem de outros Digeneas por apresentar sexos separados. São parasitos delgados e longos. O macho é esbranquiçado, com aproximadamente 10 mm de comprimento (Figura 4). Possui uma ventosa anterior oral, afunilada, e, próxima a esta, uma segunda ventosa pedunculada, o acetábulo. O espaço entre as duas ventosas é desprovido de tubérculos, espinhos e papilas sensoriais (REY, 2008). A ventosa apresenta uma musculatura formada por músculos não somáticos (MAIR, 1998).

O sistema digestivo dos vermes adultos inicia com a boca encontrada no centro da ventosa oral, sendo esta, responsável pela ingestão de alimentos e excreção dos resíduos oriundos do metabolismo. Possui um esôfago curto. Os cecos intestinais percorrem lateralmente o corpo do verme, e na extremidade média corporal, se unem formando um ceco único em formato terminal de saco (HOCKLEY, 1973). No aparelho digestivo são encontradas enzimas do tipo peptidases responsáveis pela digestão do sangue do hospedeiro digerido (CAFREY, 2004).

O macho do *S. mansoni* possui um sistema reprodutor composto por seis a dez lóbulos testiculares. Apresenta o corpo achatado dorsoventralmente e enrolado de modo a formar uma calha ou tubo longitudinal, que recebe o nome de canal ginecofórico (Figura 3). Esse canal tem a finalidade de albergar a fêmea na hora do acasalamento e apresenta poucos tubérculos, ausência de espinhos e tegumento poroso próximo ao poro genital, apesar de não possuir receptores sensoriais (REY, 2008).



Figura 3: Casal de *S. mansoni* em cópula com a fêmea alojada no canal ginecofórico do macho (STEINAUER, 2009)

A fêmea do *S. mansoni* tem o corpo cilíndrico com um comprimento médio de 14 mm, sendo mais longa e mais fina que o macho (Figura 4). Possui cor acinzentada e

escura, devido à hemozoína presente no tubo digestivo oriundo do processo digestivo do sangue. Também possuem duas ventosas, muito próximas uma da outra (OLIVEIRA, 2000).

O sistema reprodutivo é formado por um ovário oblongo. Possuem glândulas produtoras de vitelo distribuídas pela parte posterior do corpo (FRIED & GRACZYK, 1997). O desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino é determinado pelo acasalamento com os machos e a fecundação. Dessa forma, o amadurecimento das fêmeas ocorre muito lentamente em uma infecção unissexual (KNOBLOCH, 2006).



Figura 4: Vermes adultos de *S. mansoni* (In PITTA, 2005/ Adaptada)

O sistema excretor dos parasitos é formado por células em flama, estruturas responsáveis pela eliminação dos excretas, que se ramificam e originam dois túbulos coletores que chegam até o epitélio. Eles se unem formando uma vesícula de excreção que possuem um poro excretor ou nefridióporo, tendo este, contato com o exterior, na parte distal do corpo. A função desempenhada pelo sistema excretor é basicamente fazer a eliminação e a absorção de diferentes matérias solúveis por transportes ativos (REY, 2008).

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

4.4. CICLO BIOLÓGICO

O ciclo evolutivo do *S. mansoni* é do tipo heteroxeno, pois necessita de dois hospedeiros para finalizar o seu desenvolvimento (Figura 6). O hospedeiro intermediário pode ser o caramujo do gênero *Biomphalaria Glabrata*, *B. tenagophila* ou *B. straminea* (GRYSEELS, 2006; CALDEIRA, 2009), e o hospedeiro definitivo podem ser o homem ou outros vertebrados, tais como hamster, camundongo ou coelho (PINTO, 1990).

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

Os ovos são produzidos por meio das células glandulares vitelínicas e pelo ovário das fêmeas (MICHEL, KNOBLOCH & KUNZ, 2003). Os ovos secretados no mesentério ainda são imaturos. Envolvendo o zigoto, encontra-se uma casca protéica formada por microespinhos na parte externa, e, na parte interna, verifica-se a presença de células vitelínicas, mitocôndrias, gorduras, vesículas e grânulos (ASHTON, 2001).

Cada ovo maduro apresenta um espinho lateral no seu pólo superior (Figura 5) e um miracídio formado (DIAS & RIBEIRO, 1980). O miracídio secreta enzimas proteolíticas capazes de impulsionarem os ovos para o lúmen intestinal, sendo logo em seguida, excretados junto às fezes, podendo ficar viáveis por até sete dias. Ao ter contato com a água doce, influências, tais como, hipotonicidade, temperatura e a movimentação do embrião, acarretam a liberação dos miracídios no meio (GRYSEELS, 2006).

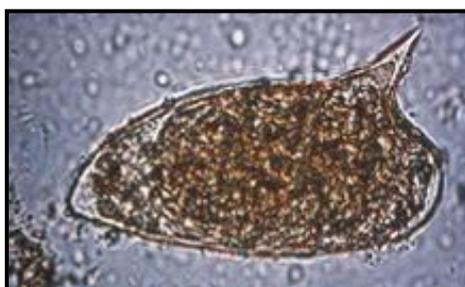


Figura 5: Ovo maduro do *S. mansoni* (CONLON, 2005)

Os miracídios permanecem na água doce nadando em círculos até o momento de encontrar seu hospedeiro intermediário, o molusco do gênero *Biomphalaria* (REY,

2008). Ao encontrar o molusco, os miracídios penetram no tegumento e chegam a se alojar em diversos tecidos do corpo do hospedeiro, transformando-se então, em esporocisto. Esses se reproduzem por poliembrionia e dão origem às cercárias. Ao acontecer qualquer rompimento do tegumento do caramujo, as cercárias abandonam seu hospedeiro intermediário e retornam à água, nadando sempre em direção à superfície e a luz (BLANCHARD, 2004).

Na medida em que essas cercárias encontram seu hospedeiro definitivo, elas iniciam seu processo de penetração pela epiderme, que dura no máximo 15 minutos. As cercárias perdem a cauda e logo em seguida, seu corpo migra ativamente pela pele do hospedeiro (CUNHA, 1970), transformando-se rapidamente em esquistossômulos (BLANCHARD, 2004).

Os esquistossômulos que não são destruídos ao chegar à pele ganham a corrente sanguínea e chegam ao coração, depois pulmões, e logo em seguida, ao fígado. No sistema porta intra-hepático, os esquistossômulos se alimentam de sangue, desenvolvem-se e reproduzem-se, chegando à fase dos vermes adultos. Após isso, os vermes migram, a maioria, acasalados, para a veia mesentérica inferior onde acontecerão as oviposições, reiniciando todo o ciclo do parasito (BLANCHARD, 2004).

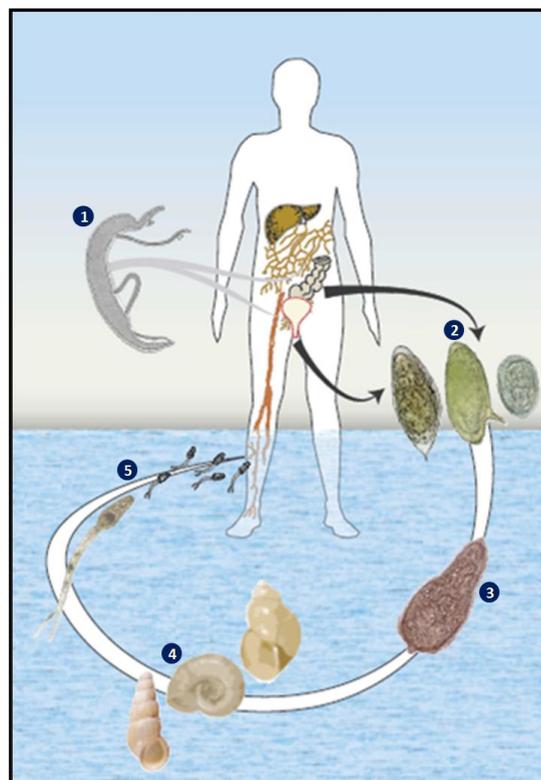


Figura 6: Ciclo de vida da esquistossomose. 1: vermes adultos do *S. mansoni*; 2: ovos; 3: Miracídios; 4: molusco do gênero *Biomphalaria glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*; 5: cercárias (GRYSEELS, 2006/adaptada).

4.5. PATOLOGIA

A patologia da esquistossomose mansônica é representada por uma forma aguda ou formas crônicas¹. A forma aguda é considerada leve sendo determinada como fase aguda ou assintomática. A forma crônica possui uma forma hepatointestinal e uma hepatoesplênica (LAMBERTUCCI, 2000).

4.5.1. Forma Aguda

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

O estágio febril da infecção pode não acontecer em indivíduos que vivem em áreas endêmicas para o *Schistosoma*. Isso acontece porque essas populações tornam-se imunes a este tipo de infecção. Entretanto, em pessoas que estão viajando por áreas endêmicas pela primeira vez e são infectadas pela parasitose, é possível que apresentem rapidamente as manifestações iniciais apresentadas pela infecção (PEARCE & MACDONALD, 2002).

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

A presença dos ovos maduros do *S. mansoni* nos tecidos e órgãos causa uma resposta inflamatória, tendo como consequência a formação de granulomas periovulares no intestino, no pulmão e, principalmente, no fígado (Figura 7). Neles se encontram uma grande quantidade de componentes exudativos, com muito eosinófilos, necrose central ou com a formação de um halo de necrose periovular (LAMBERTUCCI, 2008).

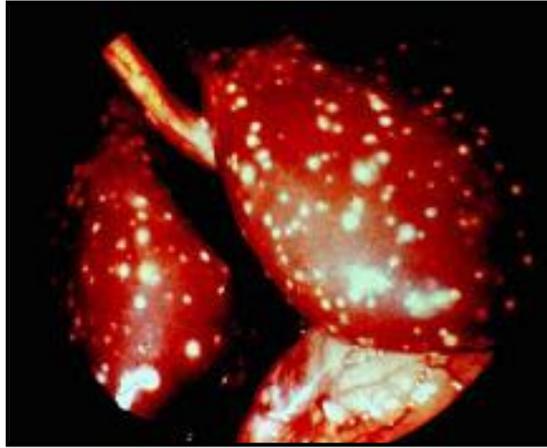


Figura 7: Imagem de fígado infectado pelo *S. mansoni*. Pontos esbranquiçados representam granulomas dispersos no parênquima hepático (LAMBERTUCCI, 2008).

4.5.2. Forma Crônica

A fase crônica da esquistossomose ocorre com maior frequência em áreas endêmicas, onde indivíduos, normalmente assintomáticos, passam a demonstrar manifestações clínicas. Vários são os fatores que podem estar envolvidos no desenvolvimento da patogenia, dentre eles podemos citar: a carga parasitária da infecção, (FILHO & SILVEIRA, 2001), o estado nutricional e a resposta imunológica do indivíduo infectado (REY, 2008). A forma crônica tem início alguns meses após a infecção acometendo vários órgãos de forma grave, apresentando formas intestinais, hepatointestinal, hepatoesplênica e ectópicas (PORDEUS, 2008).

Na fase intestinal da esquistossomose mansônica, os principais sintomas apresentados pelos indivíduos infectados são: fraqueza, fadiga, movimento intestinal irregular, dores abdominais, fezes sanguinolentas (LAMBERTUCCI, 2000), inflamação glanulomatosa da mucosa, pseudopoliposes, microulcerações e hemorragia superficial (GRYSEELS, 2006).

Na forma hepatointestinal, os ovos permanecem presos na parede intestinal, no fígado ou em vários outros órgãos. Eles secretam antígenos acarretando uma resposta inflamatória glanulomatosa (COON, 2005). O granuloma que inicialmente já estava sendo desenvolvido na fase aguda torna-se maior e com uma resposta inflamatória mais acentuada, acarretando uma patogenicidade mais avançada nas células do fígado (SILVA, 2005).

Na forma hepatoesplênica, os pacientes esquistossomóticos apresentam crescimento e endurecimento do fígado e baço (KATZ & ALMEIDA, 2003). Isso ocorre quando os ovos depositados pelas fêmeas nos vasos do intestino são arrastados

pela corrente sanguínea e ficam retidos nos capilares dos espaços porta do fígado. Com o acúmulo progressivo dos granulomas há o desenvolvimento de um manguito fibrótico em torno das ramificações intra-hepáticas da veia porta (Figura 8) (COON, 2005). Esse processo recebe o nome de fibrose periportal e é responsável por obstruir o fluxo sanguíneo pela veia porta e, por conseguinte, gerar a formação da hipertensão porta, hepatoesplenomegalia (Figura 9) e varizes gastrointestinais (GRYSEELS, 2006) que podem em alguns casos, levar o paciente à morte (BURKE, 2009). O aumento de tamanho do baço, esplenomegalia, acontece devido à hiperplasia das células e congestão venosa do sistema retículoendotelial (LAMBERTUCCI, 2008).

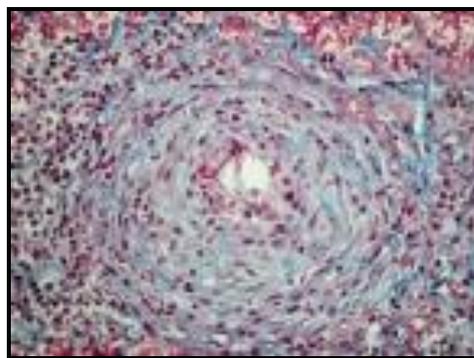


Figura 8: Granuloma hepático da fase crônica com predomínio de tecido fibroso (GRYSEELS, 2006).



Figura 9: Paciente com hepatoesplenomegalia (LAMBERTUCCI, 2008).

Na fase mais avançada da forma crônica, a de hepatosplenomegalia descompensada, há a ocorrência de hemorragias digestivas, derrame cavitário, o que acarreta a ascite e posteriormente, podem causar o comprometimento dos hepatócitos. Devido a isso, o órgão perde a capacidade de realizar suas atividades normais, levando o paciente a um estado clínico de caquexia podendo progredir para o coma hepático

(REY, 2008). A partir do surgimento de novas drogas utilizadas em pacientes esquistossomóticos, pode-se observar, em alguns casos, a regressão de lesões hepáticas avançadas (KATZ & BRENER, 1966; ANDRADE, 20008).

A forma ectópica na fase crônica da esquistossomose ocorre com a migração de alguns ovos do sistema porta para os pulmões, órgãos genitais e para o Sistema Nervoso Central (SNC). Por meio das vias anastomóticas porto-cava, que ficaram abertas após a hipertensão portal, os ovos são facilmente transportados para esses órgãos. A presença de ovos nos pulmões com posterior formação de granulomas e fibrose pode acarretar problemas brônquicos e hipertensão pulmonar (GRYSEELS, 2006).

A presença de ovos nos órgãos genitais do indivíduo infectado causa no aparelho reprodutor feminino, lesões ulcerativas e hipertróficas da vulva e da vagina. Também podem ocorrer danos nos ovários e nas trompas de falópio, apresentando casos de infertilidade (GRYSEELS, 2006).

A neuroesquistossomose é causada pela presença dos ovos no Sistema Nervoso Central (SNC), sendo encontrados mais freqüentemente na medula espinhal que no cérebro. As lesões produzidas dependem da quantidade dos ovos e da resposta imunológica do hospedeiro (FERRARI, 2008). Com a presença desses ovos, substâncias antigênicas e imunogênicas começam a secretar uma reação granulomatosa periovular para a formação de granulomas necróticos-exsudativo (LAMBERTUCCI, 2000) e presença de sintomas tais como: hipertensão intracraniana e mielite transversa que afeta a medula espinhal (GRYSEELS, 2006).

4.6. DIAGNÓSTICO

A importância da realização do diagnóstico da esquistossomose mansônica tem a finalidade de contribuir tanto para os estudos epidemiológicos quanto para a pesquisa terapêutica (BECK, 2008). Os dados epidemiológicos auxiliam a quantificar as infecções através dos históricos de banhos nas águas infectadas, e ao mesmo tempo ajuda a prever em que nível patológico o indivíduo se encontra (SILVA, 2005).

Os métodos clássicos para a obtenção do diagnóstico da esquistossomose mansônica são classificados como qualitativos e quantitativos. Alguns exames parasitológicos realizados para o diagnóstico dependem da presença de ovos do parasita nas fezes do indivíduo infectado, tais como o Método de Lutz que se caracteriza como sendo um método qualitativo e o Método de Kato, considerado um método quantitativo

(BECK, 2008). Além desses, existem os métodos de eclosão miracidiana, biópsia retal e testes imunológicos, sendo estes menos utilizados na maioria dos casos (KATZ & ALMEIDA, 2003).

A técnica de Lutz, também denominada como método de Hoffman, Pons e Janer consiste na sedimentação espontânea das fezes por volta de duas horas, que são diluídas na água, para a concentração dos ovos nos helmintos. Em seguida é feita uma lâmina para ser observada no microscópio óptico. Nessa técnica, há a possibilidade de verificar a viabilidade dos ovos, exceto se não for utilizado nenhum tipo de corante (REY, 2008). É um dos métodos utilizados entre os laboratórios por apresentar baixo custo, maior facilidade no manuseio e, além disso, diagnosticar a presença de outras parasitoses (REY, 2008).

A técnica mais utilizada no âmbito da saúde pública é o método de Kato-Katz, que é recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), por ser um exame mais preciso, de baixo custo e de fácil utilização (KATZ & ALMEIDA, 2003). É um procedimento que tem a função de verificar a carga parasitária no indivíduo infectado através do número de ovos presentes nas fezes e desse modo, determinar a intensidade da infecção (ELLIOTT, 1996).

A infecção esquistossomótica é dita elevada quando a carga parasitária verificada for acima de 500 ovos/grama de fezes. Definida como moderada quando a intensidade da carga está entre os valores de 100 a 500 ovos/grama de fezes e considerada baixa quando a carga parasitária está abaixo de 50 ovos/grama de fezes. Esse menor valor causa limitações à técnica de Kato-katz, sendo necessário aumentar o número de amostras ou de lâminas (RABELO, 2008).

Além dos testes parasitológicos utilizados para diagnosticar a esquistossomose, existem os métodos imunológicos tais como: ELISA, imunofluorescência e Reação Periovular, que consistem na utilização do soro do paciente em busca de encontrar a presença de anticorpos anti-*S. mansoni*, IgG e IgM. Os antígenos usados nesses procedimentos são os vermes, ovos ou cercárias (VRANJAC, 2007).

4.7. TRATAMENTO

O tratamento da esquistossomose tem como finalidade a cura dos pacientes infectados (BRASIL, 2005). As medidas de tratamento para a diminuição da morbidade da esquistossomose mansônica em áreas endêmicas pelos pesquisadores brasileiros se

baseiam, quase que exclusivamente, no uso da terapêutica em larga escala (HOMEIDA, 1991; EL SAYED, 1997; RICHTER, 2003). Conhecido como tratamento em massa, e com poucas contra-indicações, o composto atualmente empregado no tratamento da esquistossomose mansônica, caracteriza-se por sua eficácia e toxicidade relativamente baixa (KATZ, 2008).

A terapêutica deve vir associada ao saneamento básico, aplicação de moluscicidas nas áreas infectadas pelo *S. mansoni* e a campanhas de educação em Saúde Pública para a população residente nestas áreas infectadas com o intuito da obtenção do controle da transmissão. Uma possível conquista no controle da esquistossomose seria o desenvolvimento de uma vacina, com disponibilidade no mercado. Nesse âmbito, vários estudos vêm sendo realizados, porém ainda encontra-se em fase experimental (KATZ & COELHO, 2008).

O tratamento do paciente infectado com esquistossomose mansônica vem sendo realizado através da quimioterapia, desde 1918, quando Christopherson sugeriu a utilização dos compostos antimoniais (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995). Algumas décadas depois, vários compostos foram surgindo tais como: a emetina, o niridazol, o lucantone, o metrifonato, o artemether, o artesunato, o oxaminiquine e o praziquantel, a maioria deles com suas funções químicas e mecanismos de ação próprios, sendo o praziquantel, o mais utilizado atualmente no setor da Saúde Pública (FILHO & SILVEIRA, 2001).

Mesmo alcançando a redução da morbidade dos pacientes infectados pelo *S. mansoni*, a quimioterapia ainda não é capaz de proporcionar ao paciente infectado e tratado uma resistência a reinfecção (KATZ & COELHO, 2008). O benefício até o momento apresentado pela quimioterapia é a redução da intensidade da infecção e, em alguns casos impedir que os indivíduos infectados evoluam para a fase crônica da doença. O êxito terapêutico obtido até o momento é alcançado através da intervenção em larga escala ou por tempo indefinido com os quimioterápicos em áreas infectadas (CAPRON, 1998). A quimioterapia como forma de tratamento em massa torna-se dispendiosa e, ao mesmo tempo possibilita o desenvolvimento de uma baixa suscetibilidade do fármaco ao parasito acarretando em uma menor eficácia do tratamento (FILHO & SILVEIRA, 2001).

Um exemplo de uma possível resistência aos fármacos vem acontecendo com os vermes adultos do *S. mansoni* dos pacientes infectados no Senegal e no Egito (STELMA, 1995 & ISMAIL, 1996) ao passarem por diversos tratamentos com o

praziquantel. Devido a isso, surge uma necessidade de que haja a descoberta de novos quimioterápicos mais eficientes contra a parasitose e que ao mesmo tempo, possua um menor custo e toxicidade (MELMAN, 2009).

4.7.1. Agentes Esquistossomicidas

Os compostos antimoniais foram empregados originalmente como cosméticos e fármacos pela civilização antiga. Em 1918, houve o início e sua utilização como alternativa para o tratamento de algumas doenças parasitárias. Esses compostos foram usados no tratamento da esquistossomose por mais de 50 anos. Porém, devido aos seus elevados efeitos tóxicos e colaterais, foram substituídos por outros medicamentos (DEMICHELL & FRÉZARD, 2005).

Com importância histórica, evidente, os compostos antimoniais foram os primeiros a possuir um mecanismo de ação antiesquistossomicida proposto (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995). Ernest Bueding e colaboradores relataram que o metabolismo anaeróbico era o melhor caminho para a produção de energia nos vermes adultos do *Schistosoma mansoni*. Os compostos antimoniais conseguiam inibir a atividade glicolítica da fosfofrutoquinase (PFK) nos vermes adultos do *S. mansoni*, impedindo a catálise da frutose-6-fosfato (F6P) em frutose-1,6-difosfato (FDP), tendo como consequência a morte do *Schistosoma* (BUEDING, 1950). Isso acontece porque a PFK é a principal enzima responsável pela glicólise no parasito, dependendo o mesmo, da PFK para a produção de energia e conseqüentemente, para a sua sobrevivência (SU, MANSOUR & MANSOUR, 1996).

O primeiro composto antimonial a ser utilizado foi o tártaro emético (Tabela 01) (KATZ, 2008). Esse composto era administrado por via endovenosa em pacientes com esquistossomose mansônica durante um mês com múltiplas doses, causando vários efeitos colaterais tais como: diarreia, vômitos, problemas cardiovasculares e sintomas anafilactóides, fazendo com que muitos indivíduos abandonassem a terapia (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995).

O segundo composto a ser utilizado no tratamento da esquistossomose foi a emetina, o qual foi utilizado, inicialmente no tratamento da esquistossomose japônica e amebíase (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995). Porém, a necessidade de doses elevadas em pacientes com esquistossomose, acarretava um alto grau de toxicidade. Com isso, estudos foram realizados e originaram um derivado análogo da emetina, o 2,3-di-hidroemetina (Tabela 01) que possui as mesmas atividades da emetina

original, no entanto, possui um efeito tóxico reduzido em cerca de 50% (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995).

O 2,3-di-hidroemetina era administrado em pacientes esquistossomóticos, através de injeções diárias, e apresentavam bons resultados de cura, com poucos efeitos colaterais. Porém o modo como a emetina era conduzido periodicamente necessitava de hospitalização do indivíduo infectado. Isso fez com que esse composto deixasse de ser utilizado como agente esquistossomicida, sendo utilizado até hoje, apenas para os casos de pacientes com amebíase (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995).

Em 1960, surgiu o metrifonato (Tabela 01), um derivado organofosforos 2,2,2-tricloro-1-hidroxietil dimetil fosfonato (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995) que se caracteriza por apresentar atividade anticolinesterase (EDITORIAL ARAB, 2009). Porém, estudos demonstraram que o metrifonato apresentou maior atividade nos parasitos do *S. haematobium* (DAVIS & BAIELY, 1969), do que nos parasitos do *S. mansoni* e do *S. japonicum* (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995).

Uma das melhores vantagens do metrifonato é o seu baixo custo de produção. Também apresentam poucos efeitos colaterais e tóxicos. Há várias hipóteses para o seu mecanismo de ação, porém, o mais aceito está relacionado à inibição da enzima acetilcolinesterase, ocorrendo um acúmulo de acetilcolina e, por conseguinte, paralisia do verme (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995).

O metrifonato é considerado um pró-fármaco por ser instável em meio aquoso se transformando espontaneamente em alguns compostos. Dentre eles, destaca-se o diclorvos, 2,2-diclorovinil dimetil fosfato ou DDVP (RACCHI, 2004) (Tabela 01). O diclorvos apresentou atividade mais expressiva quando comparado ao metrifonato apresentando um potencial inibitório da acetilcolinesterase cem vezes maior que o metrifonato (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995) sendo bem tolerado sem alterações clínicas significativas, apresentando alguns efeitos tais como náuseas, cólicas e diarreia (RACCHI, 2004).

A necessidade de novos fármacos que apresente um espectro mais amplo, levou ao estudo do lucantone, o 1-[2-(dietilamino)etilamino]-4-metil-9H-tioxanthen-9-ona (Tabela 01), que destacou-se por ter atividade esquistossomicida contra o *S. mansoni* e o *S. haematobium*. O lucantone chegou a ser utilizado na prática médica com doses orais de 20mg/Kg durante cinco dias consecutivos, apresentando poucos efeitos colaterais iniciais tais como náuseas e vômitos. Entretanto, a utilização desse composto apresentou

em alguns casos problemas cardiovasculares bem severos, o que levou a descontinuidade de seu uso (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995).

Em 1964, surge o derivado nitrothiazole denominado niridazol (Tabela 01). Esse composto teve grande importância na quimioterapia do tratamento da esquistossomose por também ser utilizado por via oral, porém apresentou desvantagens por necessitar da administração de várias doses e conseqüentemente, apresentar inúmeros e graves efeitos colaterais, tais como: toxicidade renal e central, mutagenicidade, carcinogenicidade, embriotoxicidade e imunossupressão celular (WEBSTER, 1975). O metabolismo do niridazol acontece inicialmente no fígado, explicando, portanto, a presença dos efeitos colaterais em pacientes com esquistossomose crônica (COUTINHO & BARRETO, 1969).

As espécies do *S. mansoni*, *haematobium* e *japonicum* são sensíveis ao niridazol, porém, a eficácia é mais expressiva no tratamento com *S. haematobium*. Os efeitos colaterais evidenciados com o uso desses fármacos são relacionados, principalmente, ao sistema nervoso central e consistem no aparecimento de alucinações, hiperexcitabilidade, convulsões e perda de consciência. Dentre os efeitos mais brandos, relatam-se náuseas, vômitos, dores abdominais, diarréias e alterações cutâneas (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995). Devido a essa gama enorme de efeitos colaterais apresentados pelo niridazol, fica inviável a administração da droga por vários dias no tratamento da parasitose (KATZ & COELHO, 2008).

O mecanismo de ação do niridazol está relacionado a uma ligação covalente desse composto à macromoléculas existentes no parasito. Esse composto, na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) em condições anaeróbicas, desencadeia uma redução enzimática do grupo nitro, acarretando a formação de moléculas intermediárias reativas capazes de se ligarem covalentemente às macromoléculas presentes no parasito do *Schistosoma* (TRACY, CATTO & WEBSTER, 1983). Isto pode levar a morte do parasito por diversos motivos, porém esse mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995).

As propriedades do Artemeter, um éter β -metil derivado da dihidroartemisina (Tabela 01) extraída de uma planta chinesa, a *Artemisia Annuua* (CHEN, 1980), foram descritas por volta do ano de 1980 sendo utilizada no tratamento da malária e contra o *S. mansoni* (XIAO & CATTO, 1989). Em 1982, surge o primeiro relato de atividade esquistossomicida desse composto contra o *S. japonicum* (LE, YOU & YANG, 1982).

E, em 2000, foi comprovado o seu potencial esquistossomicida contra o *S. haematobium* (XIAO, 2000). O artemeter apresenta uma alta atividade contra estágios juvenis do parasito, ao mesmo tempo em que possui uma menor eficácia contra os vermes adultos do *Schistosoma*. Devido a sua maior eficácia no período inicial do desenvolvimento do parasito, esse fármaco é indicado para o tratamento de indivíduos na fase aguda (SHUHUA, 2002).

O mecanismo de ação do artemeter ainda não está totalmente esclarecido, porém, alguns relatos importantes da descoberta desse mecanismo tem sido descritos nessa última década, sugerindo que haja uma inibição da ATPase e de enzimas envolvidas na glicólise, acarretando em uma diminuição da taxa de glicogênio e de proteínas no verme. O Artemeter causa alterações tegumentares com formação de vacúolos e danos nas células vitelínicas femininas dos vermes adultos do *Schistosoma*. O derivado possui ainda a capacidade de reduzir a carga parasitária e diminuir as lesões afetadas através dos ovos dos vermes no organismo infectado. Verificou-se também que o Artemeter é mais eficiente, causando maiores danos em vermes fêmeas do que em vermes machos (SHU-HUA, 2005).

Em estudos experimentais de animais esquistossomóticos ao realizar administração do praziquantel associado ao artemeter observou-se uma maior eficiência no tratamento com maior redução dos vermes e diminuição na oviposição. Porém, mais estudos experimentais são necessários para determinação do potencial desses dois derivados quando agregados (CAFREY, 2007).

Um ano após a descoberta do artemeter, o mesmo grupo de pesquisadores publicou a estrutura química e as atividades do composto artesunato, o dihidroartemisin-10- α -succinato (Tabela 01), ressaltando a sua atividade esquistossomicida contra o *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*, *S. mekongi* e *S. haematobium* (SHU-HUA, 2005).

As descobertas do artemeter e do artesunato representaram importantes contribuições para o campo de pesquisa das drogas esquistossomicidas (YUAN, 2000). Há estudos em modelos experimentais relacionados com a presença de uma mistura entre o praziquantel junto ao artemeter e o artesunato no tratamento da esquistossomose, que vem apresentando uma redução significativa na carga de vermes do *S. mansoni* (UTZINGER, 2002).

Outro composto bastante utilizado nos pacientes infectados com *S. mansoni* é a oxaminiquine (OXA), um derivado 2-aminometiltetrahydroquinolina (Tabela 01),

considerada um dos agentes esquistossomicidas mais promissores, ficando atrás apenas do praziquantel. Caracteriza-se por ter um efeito anticolinérgico que aumenta a mobilidade do parasito e inibe a síntese dos ácidos nucléicos. Apresenta atividade contra o *S. mansoni*, mas é ineficaz em infecções de *S. japonicum* e *S. haematobium* (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995).

A oxaminiquine é administrada oralmente em uma única dose, sendo 15 mg/Kg para adultos e 20mg/Kg para crianças. A taxa de cura está representada por volta de mais de 83% quando verificada através de exames de fezes (FERRARI, 2003). Após sua administração, esse fármaco é rapidamente metabolizado, sendo de fácil absorção e excreção (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995).

O mecanismo de ação da oxaminiquine ainda não está bem esclarecido. Porém, há relatos que o derivado é enzimaticamente convertido em éster através da quinase ou da sulfotransferase, o que pode alquilar o DNA do *Schistosoma*, definindo o grupo metilhidroxil essencial a atividade biológica (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 2003). A oxaminiquine representa uma melhor eficácia em vermes machos do que nos vermes fêmeas (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 1995) e contra todos os estágios imaturos do verme (KATZ, 2008).

Os efeitos colaterais mais comumente apresentados após a sua utilização baseiam-se no aparecimento de tonturas, náuseas, cefaléia, sonolência e em pequena quantidade dos pacientes é possível a ocorrência de irritação, excitação nervosa, alucinações ou convulsões (KATZ, 2008) com nenhum caso de óbito relatado (AMARAL, 2006). Devido à boa tolerância encontrada no tratamento com a oxaminiquine em pacientes esquistossomóticos, esse fármaco pôde ser recomendado para o tratamento das infecções por esquistossomose nas áreas endêmicas (KATZ, 2008).

Nos últimos 20 anos, a oxaminiquine apresentou papel fundamental na terapêutica da infecção do *S. mansoni* (RICHTER, 2003). Porém, esse cenário mudou de figura com o aparecimento da resistência da oxaminiquine nas infecções no Brasil e também devido ao surgimento do praziquantel, apresentando melhor eficácia no tratamento da parasitose (LAMBERTUCCI, 2000; SACONATO & ATALLAH, 2000).

O praziquantel (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino{2,1-a}isoquinolina-4-ona) (PZQ) (Tabela 01) é classificado como uma pirazinoisoquinolina que foi descoberta em 1970 (GREENBERG, 2005). Utilizada no tratamento de parasitos céstodas e tremátodas (DAYAN, 2003), destacando-se principalmente como fármaco de

escolha para o processo terapêutico da esquistossomose por ser eficaz contra todas as espécies de *Schistosoma* (TALLIMA & RIDI, 2007) e por apresentar ao contrário dos outros fármacos anteriormente citados, menor quantidade de efeitos adversos (GREENBERG, 2005).

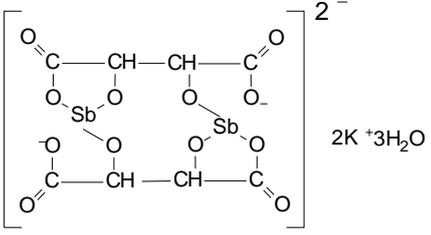
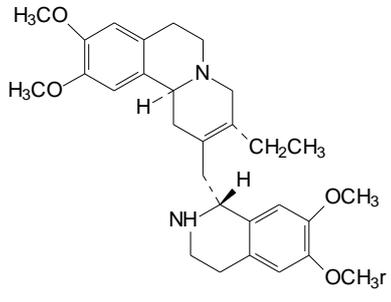
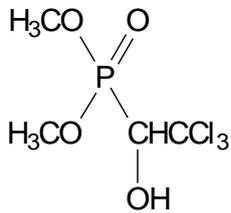
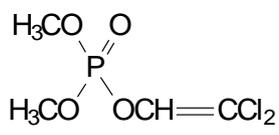
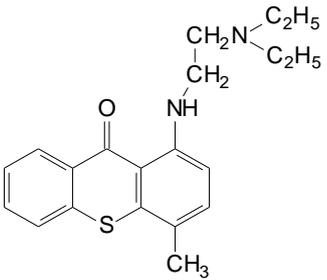
Em comparação a oxaminiquine, que continuou sendo produzido apenas pelas indústrias farmacêuticas, o praziquantel teve seu custo diminuído a partir de uma iniciativa do governo na qual o Ministério da Saúde no Brasil decidiu produzi-lo em larga escala (KATZ, 2008). A dose preconizada do praziquantel para o tratamento da parasitose no Brasil é de 60mg/kg para crianças e de 50mg/kg para adultos infectados com taxa de cura por volta de 80-90%. Com relação aos seus efeitos colaterais após administração, observa-se a presença de dores abdominais, diarreia, náuseas, vômitos, anorexia e febre (KATZ, 2008).

O mecanismo de ação do praziquantel não está ainda bem definido, mas se caracteriza por causar contração com posterior paralisia muscular, devido a uma mudança de voltagem nos canais de cálcio causando influxo rápido de íons cálcio para o interior do verme (GREENBERG, 2005), alteração com danos tegumentares e eventual morte do parasito (PICA-MATTOCCIA, 2008). A alteração tegumentar acarreta a exposição dos antígenos do parasito na superfície de membrana do verme para o desencadeamento da resposta imunológica (WATSON, 2009) com formação de granulomas e posteriormente destruição dos vermes (DOENHOFF, 1987).

Há hipóteses de que o praziquantel desestabiliza a bicamada lipídica ao interagir com a superfície tegumentar do verme. Os canais de cálcio presentes no parasito são complexos protéicos formados por subunidades moduladoras denominadas β -subunidades (JEZIORSKI & GREENBERG, 2006), responsáveis pela regulação do fluxo de Ca^{2+} (TALLIMA & RIDI, 2007). Com isso, estudos sugerem que essas β -subunidades podem estar envolvidas nesse mecanismo de ação por ter exibido aumento da amplitude geral dos canais na presença do PZQ (TALLIMA & RIDI, 2007).

O uso prolongado e único do praziquantel no combate a esquistossomose mansônica, vem desencadeando o surgimento de relatos de cepas do *S. mansoni* possivelmente resistentes a esse fármaco, como é o caso da baixa eficácia no tratamento de trématodas existentes no Vietnã (RONKETTI, 2007), e da resistência de indivíduos infectados tratados que apresentaram tolerância ao praziquantel no Senegal e no Egito (FALLON, 1995; ISMAIL, 1996). Devido a essa problemática, surge a necessidade na

busca de um substituto do praziquantel que pode ser obtido através da síntese de análogos do mesmo (RONKETTI, 2007).

	<p>Tártaro Emético</p>
	<p>2,3-Dihidroemetina</p>
	<p>Metrifonato</p>
	<p>Diclorvos</p>
	<p>Lucantone</p>

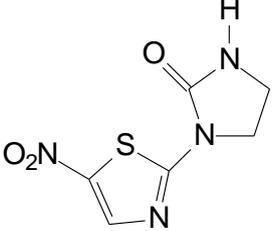
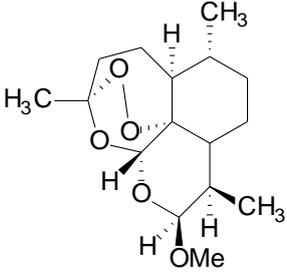
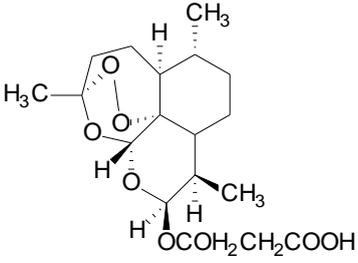
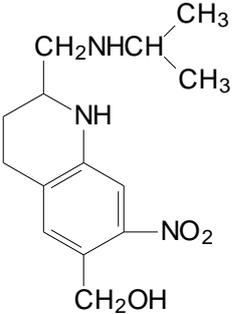
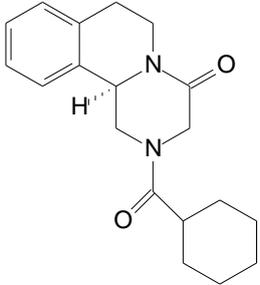
	<p>Niridazol</p>
	<p>Artemeter</p>
	<p>Artesunato</p>
	<p>Oxaminiquine</p>
	<p>Praziquantel</p>

Tabela 01: Agentes esquistossomicidas

4.8. RESISTÊNCIA AOS FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS

A resistência aos fármacos consiste na perda da sensibilidade dos parasitos, transmitida geneticamente, a um determinado fármaco (CIOLI, PICA-MATTOCCIA & ARCHER, 2003). Existe a resistência natural (tolerância) e a adquirida. Em casos de resistência natural, a cepa do *S. mansoni* já apresenta tolerância mesmo sem ter tido contato anteriormente com o agente esquistossomicida (FALLON, 1995). Um exemplo disso é que há relatos em que a oxaminiquine foi mais efetiva contra as cepas de *S. mansoni* do Leste da África do que contra as cepas do Oeste da África (FALLON, 1998).

Na resistência adquirida observou-se que doses de fármacos esquistossomicidas foram eficazes no tratamento da esquistossomose mansônica e com um tempo, tiveram o seu potencial reduzido no combate às cepas desse parasito. A resistência desenvolvida pelo *S. mansoni* parece ser transmitida geneticamente para as gerações futuras (FALLON, 1998). Estudos demonstraram que cepas mantidas em laboratório apresentaram resistência contra a oxaminiquine e o hancantone após a administração de uma única dose da droga (FALLON, 1998).

Em 1994, estudos em áreas endêmicas existentes no Senegal e no Egito relataram o primeiro caso de cepas do *S. mansoni* com resistência ao praziquantel (STELMA & TALLA, 1995 & ISMAIL, 1996). No Senegal a taxa de cura dos pacientes tratados com uma dose de 40mg/kg foi de apenas 36-39%, todavia, esses indivíduos apresentaram redução da quantidade de ovos em cerca de 85%. Na tentativa de se obter uma melhor eficácia no tratamento, passou-se a administrar uma maior dose do praziquantel (60mg/kg). Porém, não houve aumento de cura significativo, implicando então no levantamento de hipóteses, dentre elas o surgimento da resistência da cepa ao praziquantel, que foi posteriormente comprovado através de várias pesquisas e repetições dos experimentos nos senegaleses infectados (STELMA, SALL & DAFF, 1997). É importante ressaltar que apesar de ser baixa a taxa de cura dos indivíduos com *S. mansoni* tratados com o praziquantel, o mesmo ainda tem a capacidade de regredir a intensidade da infecção e limitar a morbidade dos indivíduos tratados no Senegal (FALLON, 1998).

No Egito, o praziquantel é utilizado desde 1980 (FALLON, 1998). Todavia, nos últimos anos, houve uma baixa taxa de cura em pacientes tratados com esse fármaco. Isso pôde ser verificado em mais de mil pessoas infectadas residentes nas regiões do Delta no Nilo, onde após tratamentos sucessivos, com doses de 40mg/kg e

posteriormente, com doses de 60mg/kg foi possível encontrar ovos viáveis nas fezes desses indivíduos. Esses estudos contribuem para a constatação de uma possível existência da tolerância ou resistência das cepas do *S. mansoni* ao praziquantel (ISMAIL, 1996).

4.9. PERSPECTIVAS DE NOVOS FÁRMACOS

Atualmente, a busca por novos fármacos esquistossomicidas vem aumentando significativamente devido, principalmente, à ausência de vacinas que sirvam de alternativa para o tratamento da parasitose. Além disso, a monoterapia demonstra a necessidade da busca de novos compostos mais toleráveis e que possuam um baixo custo para que possam ser acessíveis a todos os níveis sociais (KATZ, 1999; FALLON, 1998 & OLIVEIRA, 2008).

4.9.1. Tiazolidinas

As tiazolidinas (TZDs) são compostos heterocíclicos pentagonais possuindo em sua estrutura, átomos de enxofre na posição 1, um átomo de nitrogênio na posição 3, um grupo carbonila na posição 4, podendo apresentar três substituintes nas posições 2, 3 e 5 do anel (Figura 20) (LIESEN, 2008).

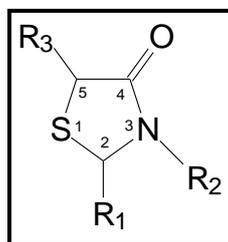


Figura 10: Anel da tiazolidina

Existem várias rotas sintéticas que servem de metodologia para a obtenção das tiazolidinas na literatura (VERMA & SARAF, 2008). Entre elas destacam-se as reações de ciclização entre os ácidos α -haloacéticos ou ácido mercaptoacético com tiouréias (BROWN, 1961), acil-tiossemicarbazidas e tiossemicarbazonas; reações do tipo cicloadição do ácido α -mercaptoacético com tiossemicarbazonas; reações de condensação entre α -mercaptoacético, aminas primárias e reações de ciclização entre moléculas que apresentam ligação dupla ou tripla conjugada com o grupo carbonila, como anidrido maléico ou acetilenodicarboxilato de dimetila e compostos que apresentam a função tioamida, como as tiossemicarbazonas (LIESEN, 2008).

Novas tiazolidinas estão sendo formadas através do bioisosterismo, através da modificação e variação molecular nessas três posições encontradas no anel tiazolidínico (GÓES, 2004). As tiazolidinas, por exemplo, são bioisósteros das imidazolidinas e oxazolidinas, apresentando desta forma, propriedades semelhantes (LANGMUIR, 1909). Atualmente, sabe-se que as tiazolidinas possuem atividade anticonvulsivante, hipnótica, antihelmíntica, antibacteriana, anticancerígena, anti-fúngica, antihistamínica, antiviral, antiinflamatória (VERMA, 2008), anti-fibrótica (KON, 2002), anti-diabética, anti-arterosclerose (PERGAL, 2005), antimicrobiana (BOZDAG-DUNGAR, 2007), e antiprotozoária (LIESEN, 2008).

Vários compostos da série 2-(arilimino)/(arilhidrazono)-3-aril/(alquilaril)/furfuril/2-pirimidil/cicloalquil/(amino substituído)/(3-(N-morfolin-4-il-propil)-4-tiazolidinonas têm apresentado atividade anticonvulsivante. Enquanto para atividade hipnótica destacam-se a 3-(3-(N-morfolin-4-il-propil)-2-(arilimino)-4-tiazolidinonas e a 2-(arilimino)-3-(pirimidin-2-il)-4-tiazolidinonas. Na atividade antihelmíntica, vários compostos derivados da 2-tiono-3-substituído-5-[(2-metil-4-nitrofenil) azo]-4-tiazolidinonas e da 2-tiono-3-metil-5-[(2,4-dinitrofenil)azo]-4-tiazolidinona apresentaram eficácia (VERMA, 2008).

Na atividade antiinflamatória, a 3-(4-bromo-2-carbo-xifenil)-5-metil-4-tiazolidinonas 2-substituídas foram testadas sobre a redução do edema (GOES, 2004). Outros derivados tiazolidínicos foram patenteados por inibir as enzimas cicloxigenase e 5-lipoxigenase (WALSH, 1991).

Dentre alguns dos agentes antihiperlipemiantes avaliados como candidatos ao tratamento da diabetes tipo 2 foram o 5-(3-aril-2-propinil)-5-(arilsulfonil)tiazolidina-2,4-dionas, 5-(3-aril-2-propinil)-5-(arilsulfanil)tiazolidina-2,4-dionas (WROBEL, 1998), como também compostos da série do 5-aril tiazolidina-2,4-dionas (DESAI, 2003) atuando como agonistas do PPAR γ (peroxisome proliferator-activated receptors) (KON, 2002).

Como agentes antimicrobianos, destacam-se a 1,3-tiazolidina contra as bactérias gram-positivas estafilococos, estreptococos e enterococos. A 3-substituída-benzil-5-(4-cloro-piperidina-1-il- tiazole- 5- il-metileno)- tiazolidina-2,4-diona apresentou atividade comparável à penicilina, fármaco utilizado no tratamento contra a *Echerichia coli*. Derivados do tiazolo-substituído benzil-2,4-tiazolidinadiona apresentaram atividade contra várias bactérias e o fungo *Candida albicans* (BOZDAG-DUNGAR, 2007).

Na atividade antiprotozoária, os derivados do ácido 2-[(fenilmetileno)hidrazono]-3-fenil-4-oxo-5-tiazolidinoacético em experimentos *in vitro* frente à *T. gondii* demonstraram ser menos tóxicos e mais eficazes quando comparados aos fármacos utilizados no tratamento (LIESEN, 2008).

Sendo as tiazolidinas análogas das imidazolidinas, como citado acima, e pela segunda possuir atividade esquistossomicida já comprovada na literatura, é provável que as tiazolidinas, além da gama de atividades que já proporcionam também se destaquem como um alvo candidato na utilização do tratamento da esquistossomose mansônica.

4.10. PERSPECTIVAS DE NOVOS ALVOS BIOLÓGICOS

O Grupo de Trabalho Científico sobre Esquistossomose/ Treinamento em Doenças Tropicais (TDR)/ Organização Mundial de Saúde (WHO) mostra a necessidade de novos fármacos ou o melhoramento dos já existentes através de pesquisas mais aprofundadas sobre suas propriedades farmacológicas e seus alvos biológicos (ABDUL-GHANI, LOUTFY & HASSAN, 2009).

Para a descoberta de novos quimioterápicos antiparasitários é necessário identificar a interação da química medicinal através da eficácia e as propriedades farmacêuticas (adsorção, distribuição, metabolismo e excreção – ADME) do composto, validar o alvo no qual o fármaco irá atuar, a sua via de desenvolvimento, identificar as relações da estrutura-atividade entre o composto e o alvo, e observar o desenvolvimento pré-clínico e clínico do candidato a fármaco (PINK, 2005).

Potenciais alvos de drogas parasitárias vêm sendo descobertos utilizando-se métodos químicos ou de biologia molecular durante o tratamento quimioterápico, além da supervisão dos fatores bioquímicos e cinéticos encontrados entre o parasito e o seu hospedeiro (PINK, 2005).

4.10.1. Vias de Sínteses de Purinas

As vias de síntese de purinas são de grande importância para a sobrevivência dos organismos, pois elas estão relacionadas com as sínteses de ácidos nucleicos, proteínas e outros metabólitos envolvidos nas reações energéticas. Os nucleotídeos purínicos podem ser sintetizados pela via ‘de novo’ ou podem ser fornecidos pela via de salvação das purinas. A via ‘de novo’ utiliza compostos simples para a síntese de vários nucleotídeos purínicos. Enquanto que as vias de salvação das purinas necessitam de

fontes endógenas e exógenas de purinas pré-formadas (KOUNI, 2003). A purina nucleosídeo fosforilase (PNP) é uma enzima chave envolvida na via de salvação das purinas (CASTILHO, 2010).

A PNP catalisa a clivagem da ligação glicosídica de ribonucleosídeos e desoxirribonucleosídeos da guanina, hipoxantina e uma série de outros nucleosídeos relacionados na presença de ortofosfatos inorgânicos (Pi) como um segundo substrato para gerar a purina básica correspondente e uma ribose(deoxiribose)-1-fosfato (SILVEIRA, 2004 & PEREIRA, 2010).

Os parasitos do *S. mansoni* não possuem enzimas para a via de síntese das bases púricas ‘de novo’, precisando conseqüentemente, da via de salvação das purinas para suprir a necessidade de nucleotídeos para a síntese de RNA e DNA (PEREIRA, 2005). Uma das principais enzimas participantes desta via de salvação é a Purina Nucleosídeo Fosforilase encontrada no *S. mansoni* (SmPNP). A descoberta dessa enzima como importante componente da via de salvação das purinas tem sido proposto como potencial alvo para a busca de novos agentes esquistossomicidas (PEREIRA, 2010).

Dessa forma, a via de salvação de purinas e a descoberta de inibidores da enzima SmPNP tem sido extensamente explorados como alvos de drogas contra os parasitas do *S. mansoni*, podendo ser úteis no desenvolvimento de novos compostos para o combate da esquistossomose mansônica (PEREIRA, 2005).

4.10.2. Tiorredoxina Glutationa Redutase

Os vermes adultos do *S. mansoni* encontram-se em um ambiente aeróbico nos seus hospedeiros e estão constantemente expostos a compostos de oxigênios reativos através da respiração e como resultado da resposta imune do seu hospedeiro (ALGER, 2002). Devido a isso, os vermes adultos precisam de um sistema adequado a fim de controlar esse estresse oxidativo desenvolvido pelo seu hospedeiro (SAYED, 2008).

Nos hospedeiros do *S. mansoni*, existem dois sistemas redox diferentes, onde um é formado pelo tripeptídeo glutatona (GSH) e o outro sistema baseia-se na proteína tiorredoxina (Trx). Esses dois sistemas redox são realizados através de flavoenzimas oxidoreduases e pela via NADPH (Figura 11). Em um sistema redox, a glutatona redutase (GR) reduz a glutatona dissulfido (GSSG) levando a formação de dois sistemas GSH-dependentes, enquanto que a tiorredoxina redutase (TrxR) é essencial para a redução do sistema Trx-dependente (GROMER, 2004). Além de esses sistemas fornecerem proteção contra o estresse oxidativo, os sistemas GSH e o Trx também estão

envolvidos nos processos de proliferação celular e na regulação redox da expressão gênica (KUNTZ, 2007).

Ao contrário do seu hospedeiro que possui esses dois sistemas redox diferentes, os vermes adultos do *S. mansoni* apresentam uma única enzima multifuncional, a tioredoxina glutationa redutase (TGR), sendo esta responsável pela redução da GSSG e Trx no sistema redox do parasita (Figura 11) (KUNTZ, 2007).

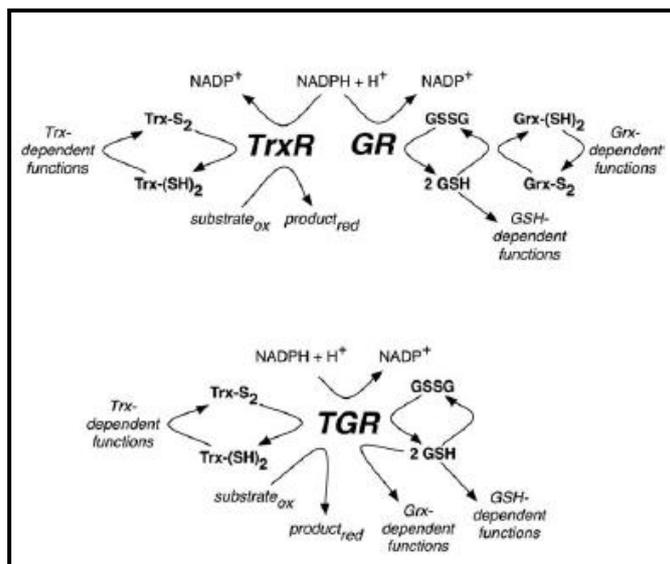


Figura 11: Vias redox em mamíferos e em *S. mansoni* (KUNTZ, 2007).

Portanto, baseando-se na existência de diferentes sistemas redox entre os hospedeiros e os vermes do *S. mansoni* e, sabendo-se que a TGR é essencial para a sobrevivência dos parasitos e se inibida leva a rápida morte do parasita, essa proteína torna-se um alvo terapêutico importante para a descoberta de novos fármacos esquistossomicidas (SAYED, 2008).

4.10.3. Proteases Cisteínas

As proteases cisteínas são fundamentais para o metabolismo de muitos parasitas (SAJID & McKERROW, 2002). Os vermes do *S. mansoni* se caracterizam por expressar numerosas proteases cisteínas as quais estão relacionadas com sua digestão, reprodução e na síntese de proteínas (CAFREY, 2004). Estudos com os inibidores fluorometil cetona básica dessas proteases diminuíram a carga parasitária e dos ovos em camundongos infectados com *S. mansoni* (WASILEWSKI, 1996).

Outro inibidor da cisteína protease recentemente descoberto foi o N-metil-piperazina-fenilalanil-homofenilalanil-vinilsulfona fenilvinil sulfona (K11777) que

apresentou uma diminuição da carga parasitária e da patologia quando testado em camundongos murinos infectados com *S. mansoni*. Além disso, como mostrado na figura 23 abaixo, houve uma diminuição do desenvolvimento e crescimento dos vermes do *S. mansoni* nos camundongos infectados tratados com o inibidor K11777 diferentemente dos camundongos infectados controle que não receberam o inibidor e tiveram seu desenvolvimento normal durante toda a pesquisa (Figura 12) (ABDULLA, 2007).

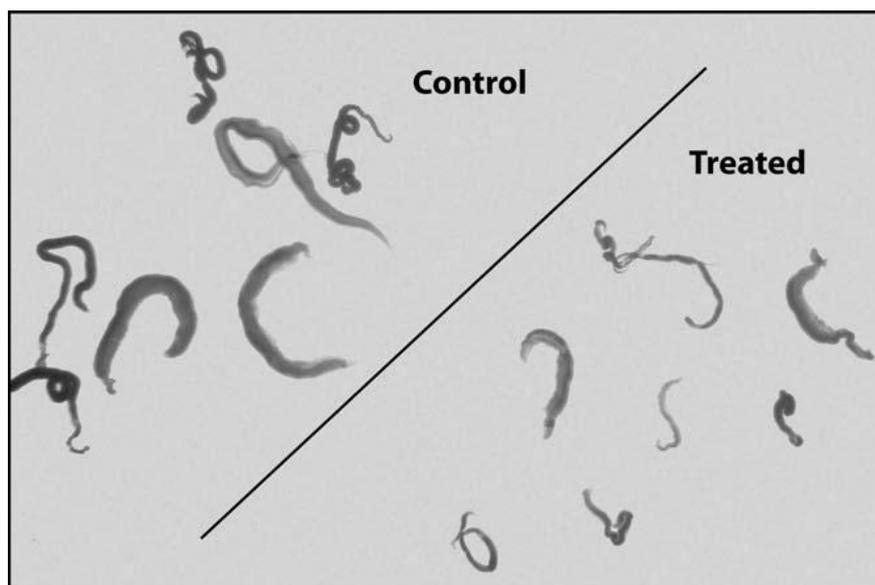


Figura 12: Vermes do *S. mansoni* tratados com o inibidor K11777 apresentando retardo do seu crescimento e vermes controle não tratados (ABDULLA, 2007).

A validação de inibidores de proteases cisteínas caracteriza-se dessa forma, como alvos de drogas e oferece um potencial alvo para a quimioterapia na esquistossomose mansônica (ABDULLA, 2007). Um tipo de protease reconhecida como alvo é a catepsina B, a SmCB2, uma endopeptidase encontrada na superfície tegumentar dos vermes do *S. mansoni*. A SmCB2 é uma enzima lisossomal e funciona no processo de penetração entre a superfície parasito-hospedeiro (CAFREY, 2002). A inibição da SmCB2 acarreta a incapacidade de penetração das cercárias e o decréscimo da carga parasitária e produção de ovos nos vermes adultos do *S. mansoni* (LIN, 1999 & WASILEWSKI, 1996). A partir dessas descobertas, estudos mais aprofundados, tais como o melhoramento da solubilidade e a redução da toxicidade vêm sendo incorporadas nas pesquisas de obtenção de vários inibidores das proteases cisteínas (ABDULLA, 2007).

4.10.4. Metabolismo dos Lipídeos

Os parasitos do *S. mansoni* possuem uma constituição celular rica em membranas. No entanto, eles não possuem a capacidade de sintetizar ácidos graxos de cadeia longa ou colesterol (MEYER & BUEDING, 1970). Embora sejam incapazes de realizar a síntese do colesterol, os vermes do *S. mansoni* conseguem sintetizar um terpenóide denominado dolicol-fosfato a partir de acetato (TEMPONE, 2002).

Em estudos realizados por RAMAASWAMY, foi demonstrado que o *S. mansoni* possui a capacidade de formação das prostaglandinas (PGE₂) e que esse mecanismo era realizado apesar da primeira etapa da síntese de prostaglandinas catalisada pela cicloxigenase, ocorrida normalmente em outros organismos não acontecer nos parasitos. A função das prostaglandinas secretadas pelos parasitos está intimamente relacionada com a atividade de imunomodulação do hospedeiro (RAMAASWAMY, KUMAR & HE, 2000). Trabalhos posteriores relataram que a indometacina, considerado um inibidor não-esteróide da síntese de prostaglandinas não é capaz de afetar o metabolismo dos lipídeos no parasito, sendo responsável, entretanto, por induzir a paralisia geral e instantânea nos vermes adultos do *S. mansoni* (RUMJANEK, 2008).

O fato de que os parasitos do *S. mansoni* não conseguem sintetizar ácidos graxos e colesterol indica que existam outros mecanismos eficientes de capturas de lipídeos do hospedeiro. Após inúmeras especulações, foi descoberta a presença de receptores de LDL nas membranas tegumentares do parasito e que esses receptores pareciam não apresentar semelhanças entre os receptores dos mamíferos, uma vez que o primeiro demonstrava apresentar um tamanho menor (RUMJANEK, 2008).

Nos mamíferos, o transporte de colesterol do meio extracelular para o interior das células acontece através da ligação da LDL pelo seu receptor celular e subsequente endocitose dos complexos formados. Em seguida, ocorre a degradação proteolítica da apoproteína no meio citoplasmático, liberação dos lipídeos e logo após, os receptores de LDL são reaproveitados, retornando ao seu sítio ativo na membrana celular, onde voltam a ficar disponíveis para ligações de novas moléculas de LDL (RUMJANEK, 2008).

Nos parasitos do *S. mansoni*, ainda não foi possível demonstrar nenhum acontecimento relatando a existência do processo fagocitose/endocitose do LDL para o meio intracelular. Essa “deficiência” pode estar relacionada com a inexistência de moléculas semelhantes à clatrina nas membranas dos vermes ou pela falta de domínios

importantes para o desenvolvimento da endocitose na molécula do receptor (TEMPONE, BIANCONI & RUMJANEK, 1997).

Desse modo, surgem hipóteses sugerindo que os receptores do *S. mansoni* exibem apenas ligações com a LDL humana, transferindo-os diretamente pelas membranas do parasito para o meio intracelular através do processo de difusão ao mesmo tempo em que beneficia o parasito ao passo em que ele adquire, em sua superfície, uma camada extra imunologicamente inerte, com a finalidade de diminuir a quantidade de lesões nos parasitos pela resposta imune do hospedeiro através do sistema complemento, eosinófilos e anticorpos (RUMJANEK, 2008).

4.10.5. Sistema Neuromuscular

O sistema neuromuscular dos vermes adultos do *S. mansoni* é considerado alvo para a descoberta de novos fármacos esquistosomicidas. Apesar de o parasito possuir um sistema de neurotransmissão e controle da atividade motora qualitativamente semelhante ao dos mamíferos, pesquisas detalhadas baseadas na modulação farmacológica dos receptores envolvidos e nas proteínas relacionadas no controle homeostático do cálcio, demonstrou apresentar diferenças entre o parasito e o hospedeiro, sugerindo a possibilidade de se haver a síntese de moléculas relativamente específicas (NOEL, 2008).

Alguns candidatos a potentes alvos esquistosomicidas foram caracterizados, tais como os receptores glutamatérgicos e a via de transmissão GABAérgica nos parasitos do *S. mansoni*, uma vez que há agonistas e/ou antagonistas que podem atuar nesses sistemas alterando a atividade motora desses vermes (NOEL, 2008).

Um alvo molecular conhecido envolvido na via de transmissão GABAérgica é o receptor benzodiazepínico, um sítio alostérico modulador do receptor GABA, que ao encontrar seus respectivos ligantes, pode desencadear um efeito esquistosomicida. Um derivado benzodiazepínico, a 3-metil clonazepan se liga a sítios específicos do parasito, apresenta mortalidade do *S. mansoni* e atividade de contração semelhante à ocorrida nos vermes quando tratados com o praziquantel. Essa capacidade de ligação específica com perfil farmacológico diferente do receptor benzodiazepínico central do mamífero aumenta a possibilidade de moléculas específicas exclusivas para os receptores presentes no *S. mansoni* (MENDONÇA-SILVA, 2004).

4.10.6. Proteína Tirosina Quinase (PTK)

Existem estratégias relacionadas à interrupção da maturidade sexual das fêmeas. O desenvolvimento das gônadas dos vermes adultos fêmeas está intimamente relacionado com o contato dos vermes adultos machos do *S. mansoni*, desencadeando um aumento do processo mitótico, acarretando o amadurecimento sexual das fêmeas (KNOBLOCH, 2006). As proteínas tirosina quinase (PTK) tem a capacidade de regular a proliferação celular, o crescimento e os processos de diferenciação entre os vertebrados e os invertebrados. Os vermes do *S. mansoni* apresentam dois tipos de PTKs, a tirosina quinase 3 (TK3) e a tirosina quinase 5 (TK5), ambas exibindo atividades no aparelho reprodutor das fêmeas do *S. mansoni*, mas especificamente nas células vitelínicas e no ovário, sugerindo desse modo, que as TKs estejam relacionadas no desenvolvimento do aparelho reprodutor feminino dos parasitos do *S. mansoni* (KAPP, 2004; KNOBLOCH, 2002).

Segundo estudos de Knobloch, foi determinado o efeito da herbimicina A como potente inibidor da PTK nos processos celulares e fisiológicos nos vermes adultos do *Schistosoma*, acarretando uma supressão da atividade mitótica nas fêmeas e uma redução da produção e viabilidade do número de ovos (KNOBLOCH, 2006). Através de análises filogenéticas, foram reveladas que existem diferenças entre PTKs dos vertebrados e invertebrados (KNOBLOCH, 2002; KAPP, 2004). Devido a isso, essas proteínas PTKs foram consideradas alvos potenciais podendo ser inibidos a fim de acarretar modificações no desenvolvimento do parasito, sem afetar qualquer atividade das PTKs dos seus hospedeiros (KNOBLOCH, 2006).

4.10.7. Canais de Cálcio

Os canais de cálcio encontrados nos parasitos do *Schistosoma mansoni* estão relacionados com o mecanismo de ação do agente esquistossomicida praziquantel. No entanto, esta via de mecanismo ainda continua desconhecida (DOENHOFF, CIOLI & UTZINGER, 2008). Os canais de cálcio são complexos protéicos formados por subunidades moduladoras denominadas β -subunidades (JEZIORSKI & GREENBERG, 2006), responsáveis pela regulação do fluxo de Ca^{2+} e que podem estar envolvidas nesse mecanismo de ação por ter exibido aumento da amplitude geral dos canais na presença do praziquantel (TALLIMA & RIDI, 2007).

Em cerca de poucos segundos de exposição do praziquantel aos vermes adultos do *S. mansoni*, ocorrem efeitos aparentes tais como a contração muscular do verme e

alterações no seu tegumento (GREENBERG, 2005). Os canais de cálcio são locais essenciais para a entrada de cálcio extracelular e podem ter um papel importante na regulação dos níveis de cálcio no meio intracelular (BLAIR, BENNETT & PAX, 1992).

Em pesquisas anteriores com a presença do Metoxiverapamil (D-600), considerado um inibidor de uma classe tipo-L de receptores de cálcio encontrado nos canais de cálcio dos mamíferos, não foram capazes de bloquear o influxo de cálcio dependente do praziquantel nos vermes adultos do *S. mansoni* (FETTERER, PAX & BENNETT, 1980). Portanto, sabendo-se que existem diferenças estruturais e farmacológicas entre as β -subunidades dos canais de cálcio existente nos mamíferos e nos vermes do *S. mansoni*, a total elucidação da composição e função desses canais podem transformá-los em possíveis alvos para a obtenção de novos agentes esquistossomicidas (DOENHOFF, CIOLI & UTZINGER, 2008; GREENBERG, 2005).

4.10.8. DNA Topoisomerases

Características bioquímicas dos vermes do *S. mansoni* tem sido amplamente estudadas e caracterizadas destacando as DNA topoisomerases como possíveis alvos na descoberta de novos agentes esquistossomicidas (ABDUL-GHANI, LOUTFY & HASSAN, 2009). Relacionados a isso, surgem os compostos acridínicos, fármacos que possuem como mecanismo de ação já comumente elucidado, a capacidade de se intercalar a moléculas de DNA e inibir as enzimas topoisomerases I e II responsáveis pelo processo de replicação celular (YANG, 2006).

A acridina (10-2-(dietilamino)etil-9-acridanona(2-tiazolin- 2-il)hidrazona), também denominada 9-acridanona-hidrazona (Figura 13) vem se destacando por ter efeito esquistossomicida quando utilizados no tratamento de camundongos infectados com *S. mansoni* (COELHO, 1995). Em trabalhos realizados por Eshete e Bennett, uma série de parâmetros foi avaliada quando camundongos infectados com *S. mansoni* receberam tratamentos com o derivado acridínico 9-acridanona-hidrazona, onde pode ser observada uma diminuição do teor de proteína chegando quase ao seu esgotamento e conseqüentemente a morte do parasito (ESHETE & BENNETT, 1990).

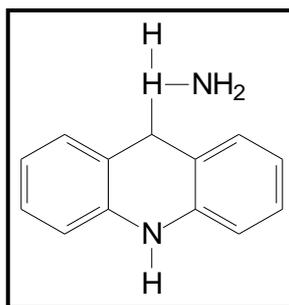


Figura 13: 9-Acridanona-hidrazona

Esse “defeito” na biossíntese de proteínas é atribuída a redução induzida pelo derivado acridínico da quantidade de RNAm no parasito (ESHETE & BENNETT, 1990) considerando a 9-acridanona-hidrazona um agente terapêutico promissor candidato ao tratamento da esquistossomose mansoni (ABDUL-GHANI, LOUTFY & HASSAN, 2009).

4.10.9. PPAR γ como Alvo Terapêutico na Fibrose Hepática

A fibrose hepática é um processo patológico crônico encontrado na esquistossomose mansônica sendo um problema clinicamente sério e fundamental diante dos diversos tipos de doenças existentes no fígado (VENNERVALD, 2005). Mesmo se apresentando como um processo progressivo, a fibrose hepática pode se tornar até em uma fase avançada, um processo reversível. Baseado nisso e em outras questões relevantes, aumenta-se o otimismo em relação a uma possível regressão total da fibrose hepática através de terapias que travem o processo de fibrinogênese e ao mesmo tempo, incentivem as propriedades naturais de regeneração do fígado. (MUDDU, 2007).

Há o envolvimento de muitos tipos celulares no desenvolvimento da fibrose hepática. Uma vez que as células do fígado sofram dano, principalmente os hepatócitos, acontecem a produção de vários mediadores, tais como espécies reativas de oxigênio e citocinas fibrogênicas que iniciam a proliferação e ativação de Células Esteladas Hepáticas (HSC), outras células fibrogênicas e uma produção de uma matriz extracelular excedente (ECM). Ao mesmo tempo, acontece uma ativação da resposta imune no fígado, tais como ativação de células de kupffer e macrófagos, que podem converter o processo fibrótico através da via de secreção de citocinas fibrogênicas e inflamatórias. (BOVENKAMP, 2007).

As Células Estelares Hepáticas (HCS) são as principais fontes de matriz extracelular, possuindo um papel importante no desenvolvimento da fibrogênese. É uma

célula armazenadora de gordura e vitamina A que, sob a ação de citocinas fibrogênicas (TGF- β , TNF- α , PDGF e outras), se diferencia em miofibroblasto e fibroblasto, se engajando na ativa síntese dos elementos da matriz (colágenos, elastina, proteoglicanos e proteínas de constituição) (ANDRADE, 2008).

As células Estelares Hepáticas (HCS) possuem receptores do tipo PPARs (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), que são fatores de transcrição nuclear que catalisam e coordenam eventos bioquímicos diferentes, a fim de encontrar um equilíbrio energético. Existem três tipos de PPARs, o PPAR α , PPAR δ , e o PPAR β/δ . Cada isoforma possui ligantes específicos, tendo como finalidade diferentes fins biológicos. (KOTA, 2005). O PPAR γ é expresso frequentemente no tecido adiposo e está relacionado com a diferenciação de adipócitos, no metabolismo de ácidos graxos e se caracteriza também por interagir com as tiazolidinadionas (TZDs), sendo seu principal alvo molecular. (KON, 2002). O receptor PPAR γ , quando ligado as TZDs, tem a capacidade de inibir a proliferação celular e a expressão de colágeno nas células estelares hepáticas primárias (HSC). Por isso, é considerado como sendo de grande valor terapêutico no tratamento da fibrose hepática (UTO, 2005).

Material e Métodos

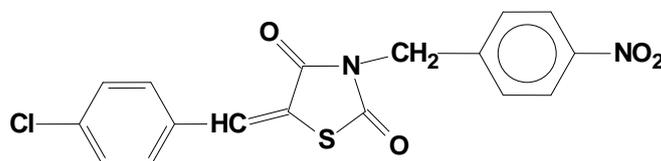
5. PARTE BIOLÓGICA

5.1. MATERIAL

- Camundongos albinos suíços (*Mus musculus*) machos e fêmeas, com 30 dias de idade, fornecidos pelo Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE);
- Cepas LE de *S. mansoni* mantida no Laboratório do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM);
- Vermes adultos do *S. mansoni* obtidos no Laboratório do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM) após realizada a perfusão dos camundongos infectados;
- Praziquantel (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino{2,1-a}isoquinolina-4-ona) (PZQ) como fármaco de modelo sendo utilizado como padrão no experimento;
- Os anestésicos cloridrato de xilasina e cloridrato de ketamina;
- Salina obtida a partir de cloreto de sódio, citrato de sódio e água destilada;
- Placas de Petri e placas de cultura com 24 poços;
- Meio RPMI 1640 completo suplementado com penicilina, estreptomicina e soro bovino fetal;
- Dimetilsulfóxido (DMSO);
- Pipeta graduada, tubos de falcon, seringa, ponteiras, álcool e matérias cirúrgicos todos esterilizados;
- Câmara de fluxo;
- Equipamento de perfusão;
- Derivados tiazolidínicos da série 5-benzilideno-3-benzil-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/SF);

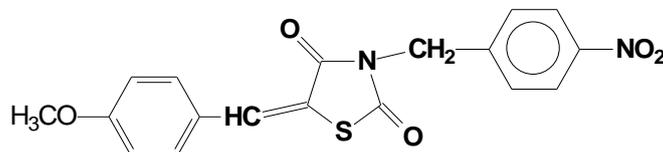
Através de dados obtidos na literatura é possível comprovar os diversos estudos baseados nas sínteses dos novos derivados tiazolidínicos descritos abaixo:

- **5-benzilideno-3-(4-nitro-benzil)-(4-cloro)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-03)**



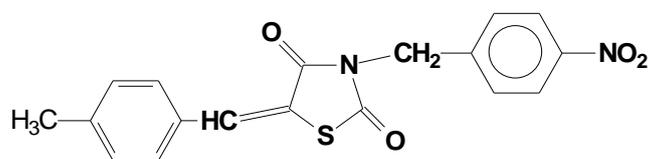
Fórmula Molecular: $C_{17}H_{12}O_4N_2ClS$; Massa Molecular: 374,5g/mol; Ponto de Fusão: 199-200°C; Rendimento: 53%; Razão de Frente e Sistema: 0,64 *n*-Hex/AcOEt 7:3; 1H RMN (DMSO, 300MHz) δ : 4,98 (s, 2H, N-CH₂); 7,59 (d, 2H, b+b¹, J=8,75 Hz); 7,59 (d, 2H, b+b¹, J=8,75); 7,67(s, 1H, =CH-); 8,20 (d, 2H, a + a¹, J= 8,73 Hz); 8,20 (d, 2H, c + c¹, J= 8,73 Hz).

- **5-benzilideno-3-(4-nitro-benzil)-(4-metóxi)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-05)**



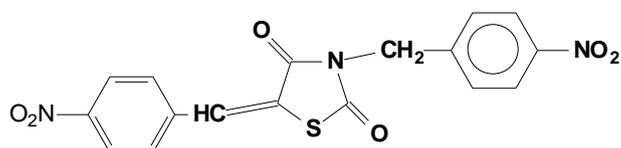
Fórmula Molecular: $C_{18}H_{14}O_5N_2S$; Massa Molecular: 370g/mol; Ponto de Fusão: 196-197°C; Rendimento: 69%; Razão de Frente e Sistema: 0,5 *n*-Hex/AcOEt 7:3; 1H RMN (DMSO, 300MHz) δ : 3,67 (s, 3H, OCH₃); 4,98 (s, 2H, N-CH₂); 6,99 (d, 2H, d + d¹, J= 8,86 Hz); 7,46 (d, 2H, b + b¹, J = 8,72 Hz); 7,59 (d, 2H, a + a¹, J = 8,79 Hz); 7,68 (s, 1H, =CH-); 8,19 (d, 2H, c + c¹, J = 8,81 Hz).

- **5-benzilideno-3-(4-nitro-benzil)-(4-metóxi)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-20)**



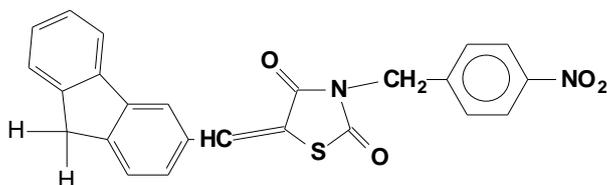
Fórmula Molecular: $C_{18}H_{14}N_2O_4S$; Massa Molecular: 354g/mol; Ponto de Fusão: 199-200°C; Rendimento: 80%; Razão de Frente e Sistema: 0,89 *n*-Hex/AcOEt 7:3; 1H RMN (DMSO, 300MHz) δ : 2,37 (s, 3H, CH₃); 4,97 (s, 2H, CH₂); 7,95 (s, 1H, -CH=); 7,37 (d, 2H, hidrogênios benzilidênicos, J= 8,69 Hz); 7,59 (d, 2H, hidrogênios benzilidênicos, J= 8,39 Hz); 7,54 (d, 2H, hidrogênios benzílicos, J= 8,39 Hz); 8,21 (d, 2H, hidrogênios benzílicos, J= 8,39 Hz).

- **5-benzilideno-3-(4-nitro-benzil)-(4-metóxi)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-22)**



Fórmula Molecular: $C_{18}H_{14}N_2O_4S$; Massa Molecular: 354g/mol; Ponto de Fusão: 228-229°C; Rendimento: 81%; Razão de Frente e Sistema: 0,5 *n*-Hex/AcOEt 7:3; 1H RMN (DMSO, 300MHz) δ : 4,99 (s, 2H, CH₂); 8,10 (s, 1H, -CH=); 7,62 (d, 2H, hidrogênios benzilidênicos, J= 8,99Hz); 7,91 (d, 2H, hidrogênios benzilidênicos, J= 8,99 Hz); 8,21 (d, 2H, hidrogênicos benzílicos, J= 8,69 Hz); 8,36 (d, 2H, hidrogênios benzílicos, J= 8,69 Hz).

- **5-benzilideno-3-(4-nitro-benzil)-(4-metóxi)-tiazolidina-2,4-diona (LPSF/SF-25)**



Fórmula Molecular: $C_{24}H_{16}N_2O_4S$; Massa Molecular: 428g/mol; Ponto de Fusão: 244-245°C; Rendimento: 53%; Razão de Frente e Sistema: 0,8 *n*-Hex/AcOEt 7:3.

5.2. MÉTODOS

5.2.1. Infecção

A infecção foi realizada por via percutânea, 15 dias após recebimento dos animais com 30 dias de idade, utilizando para cada camundongo cerca de 120 cercárias para o estudo *in vitro* e *in vivo* de *S. mansoni* (Cepa LE – Belo Horizonte) oriundas de *Biomphalaria glabrata* criados em laboratório. Após 60 dias, foi realizado exame parasitológico das fezes dos camundongos para avaliar a positividade da infecção (HOFFMAN; PONS; JANER, 1934). Esse projeto foi aprovado pelos membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) de acordo com o Processo nº 23076.022703/2009-57.

5.2.2. Perfusão do sistema porta para contagem da carga parasitária

Os camundongos foram eutanasiados com tempo de infecção de 60 dias de infecção nos estudos *in vitro* e *in vivo*. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com cloridrato de ketamina (115 mg/Kg) associada a cloridrato de xilasina (10 mg/Kg). Após anestesia, os animais foram submetidos à perfusão do sistema porta hepático para retirada dos vermes, os quais foram separados em placas de Petri contendo salina a 0,85% e em seguida os parasitos foram contados e classificados, de acordo com o sexo e vitalidade (DUVAL & DEWITT, 1967).

5.2.3. Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* frente aos derivados tiazolidínicos

Os parasitos foram removidos dos camundongos infectados com alta carga parasitária 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 soro bovino fetal a 10%. Após a lavagem os vermes adultos foram transferidos para placas de cultura de tecidos contendo 2mL de meio. Cada poço recebeu dois vermes, e em seguida foram incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após um período de 2 horas de adaptação ao meio, os derivados tiazolidínicos foram adicionados nas concentrações de 100µg/mL, 80 µg/mL, 60 µg/mL e 40 µg/mL. Essas foram as concentrações preconizadas de screening dos compostos. Os parasitos foram mantidos em cultura por 6 dias sendo monitorados a cada 24 horas para avaliação da atividade motora e da taxa de mortalidade.

5.2.4. Avaliação da atividade citotóxica das substâncias obtidas por meio sintético em culturas de células esplênicas

Camundongos machos BALB/c (6 a 8 semanas de idade) foram criados no Biotério da Fundação Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro) e mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (Recife). Todos os camundongos foram eutanasiados e tratados de acordo com a Fundação Oswaldo Cruz, da Comissão de Experiências com Animais de Laboratório (Ministério da Saúde, Brasil, 0266/05).

Células esplênicas foram obtidas de acordo com o protocolo estabelecido (XIAO, 1985). Após eutanásia do animal em câmara de CO₂, o baço de cada camundongo foi removido em condições assépticas e colocado em tubo Falcon contendo meio RPMI 1640 incompleto (ausência de soro bovino fetal, estreptomicina e penicilina). No fluxo vertical, cada baço foi transferido para placa de Petri onde foram macerados. As suspensões celulares obtidas foram transferidas para tubos Falcon contendo aproximadamente 10 mL de meio incompleto por baço, centrifugadas a 4°C, 200 x g durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, ao sedimento adiciona-se solução de lise, para promover lise das hemácias. O sobrenadante, sem conter os debris celulares, foi coletado e centrifugado a 4°C, 200 x g durante 5 minutos. O sedimento (contendo as células) foi ressuspensão em meio RPMI 1640 completo. Uma alíquota de cada suspensão celular foi separada. Em seguida, diluída em azul de trypan para ser quantificada em câmara de Neubauer, assim como verificar a viabilidade celular.

5.2.5. Avaliação da Atividade Tóxica dos Compostos em Células de Camundongos Isogênicos

Células esplênicas (6×10^5 células/poço), obtidas de acordo com item anterior, foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano, contendo meio de cultura completo. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os compostos em seis concentrações (100, 50, 25, 10, 5 e 1 $\mu\text{g/ml}$) e de timidina tritiada (1 $\mu\text{Ci/poço}$), durante 24 h, em estufa de CO_2 (5%), a 37°C . Para o controle foram utilizadas células tratadas com saponina (0,05%), células tratadas com DMSO (1%), e sem tratamento, todos com timidina tritiada (1 $\mu\text{Ci/poço}$). Cada composto foi testado em duplicata. Após 24 h de incubação, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro e, posteriormente, a captação de timidina tritiada foi determinada através do contador beta de cintilação (β -matrix 9600, Packard). O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina tritiada ($[^3\text{H}]\text{TdR}$) nos poços com as moléculas estudadas em relação aos poços não tratados. As concentrações atóxicas foram definidas como aquelas que causaram uma redução de 3H-timidina abaixo de 30% em relação aos controles não tratados.

5.2.6. Preparação da suspensão base para a dispersão sólida em PEG

O polietilenoglicol (PEG) é usado extensivamente em preparações farmacêuticas, pois apresenta segurança, hidrofiliabilidade, biocompatibilidade, ausência de antigenicidade e baixa toxicidade (PANG, 1993; YALKOWSKY, 2007; FENG, 2007).

Após a preparação do complexo contendo PEG e o derivado tiazolidínico LPSF/SF-25 em uma concentração 9:1, respectivamente, a dispersão sólida foi administrada em forma de suspensão base formada por carboximetil celulose (CMC), sorbitol a 70% e dióxido de silício coloidal. Sob agitação constante adicionou-se aos poucos o CMC até completa solubilização. Em seguida o sorbitol foi acrescentado também sob agitação constante, posteriormente o dióxido de silício coloidal. Após a suspensão base formada, separou-se a quantidade suficiente para o volume final e acrescentou o derivado tiazolidínico LPSF/SF-25. O grupo controle recebeu a mesma percentagem de PEG, disperso na suspensão base.

5.2.7. Avaliação da suscetibilidade *in vivo* de vermes adultos e formas juvenis de *Schistosoma mansoni* frente aos derivados tiazolidínicos

Os ensaios *in vivo* para determinação da atividade esquistossomicida dos compostos tiazolidínicos foram realizados com a molécula que se revelou mais ativa nos ensaios *in vitro*, o composto LPSF/SF-25.

Para o derivado tiazolidínico avaliado foram utilizados grupos experimentais formados por 10 camundongos da espécie *Mus musculus*. Grupos controles não tratados e tratados foram avaliados. A alocação dos camundongos aos grupos experimentais dar-se-á por um esquema randômico.

- Grupo I: derivado tiazolidínico LPSF/SF-25 na dose de 25 mg/Kg;
- Grupo II: derivado tiazolidínico LPSF/SF-25 na dose de 200 mg/Kg;
- Grupo III: Praziquantel (controle positivo) na dose de 25 mg/Kg;
- Grupo IV: Praziquantel (controle positivo) na dose de 200 mg/Kg;
- Grupo V: controle negativo com o veículo e o PEG.

Os camundongos foram tratados por via oral após 60 dias de infecção na fase aguda. As doses preconizadas dos compostos tiazolidínicos e do PZQ foram 25 e 200 mg/Kg⁻¹ (PICA-MATTOCCIA, 2004) durante 5 dias de administração. Após 15 dias do tratamento dos compostos, os animais foram autopsiados para determinação do número de vermes residuais. Os grupos que servirem de controle receberão o veículo utilizado para solubilizar a droga.

5.2.8. Determinação da eficácia do tratamento

A avaliação da eficácia dos derivados tiazolidínicos e do PZQ foi determinada através da redução da percentagem da carga parasitária em cada grupo tratado utilizando a seguinte equação:

$$\text{Redução de vermes (\%)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de vermes do grupo controle} - \text{n}^\circ \text{ de vermes do grupo tratado}}{\text{n}^\circ \text{ de vermes do grupo controle}} \times 100$$

5.2.9. Oograma

Três fragmentos da porção distal do intestino foram lavados em solução salina e ligeiramente secados em papel absorvente. Posteriormente foram comprimidos entre lâmina e lamínula e analisados em microscópio para realização da classificação dos ovos. Para cada fragmento 100 ovos foram contados e classificados de acordo com os seus estádios de desenvolvimento. Os ovos foram classificados em ovos imaturos viáveis (de 1º a 4º estágio), ovos maduros viáveis, e ovos inviáveis (calcificados, com miracídio retraído, semi-transparentes) (PELLEGRINO & FARIA, 1965).

Resultados e discussao

6. RESULTADOS

Com a finalidade de avaliar a ação dos derivados tiazolidínicos frente aos vermes adultos do *S. mansoni*, foram realizados os ensaios de citotoxicidade; avaliação da suscetibilidade *in vitro*; e avaliação da suscetibilidade *in vivo* através da verificação da eficácia do tratamento pelo número de vermes recuperados por meio de perfusão; e estudo da viabilidade e fases dos ovos, com o objetivo de observar a viabilidade dos ovos do *S. mansoni* após o tratamento com o derivado tiazolidínico LPSF/SF-25.

-Avaliação da citotoxicidade dos derivados tiazolidínicos em culturas de células esplênicas

A citotoxicidade foi expressa na maior concentração atóxica testada em esplenócitos de camundongos BALB/c. O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina tritiada nos poços com as drogas em relação aos poços não tratados. Os resultados demonstraram que entre os cinco derivados tiazolidínicos testados e o PZQ, fármaco controle do experimento, o composto LPSF/SF-20 e o LPSF/SF-25 apresentaram menor citotoxicidade no valor de 25 µg/mL (Tabela 02). Os compostos LPSF/SF-22, LPSF/SF-05 e o LPSF/SF-03 apresentaram valores de citotoxicidade de 10 µg/mL, 5 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente. Todos os derivados apresentaram concentrações atóxicas maiores que o praziquantel, que demonstrou ser tóxico numa concentração menor que 1 µg/mL (<1). Além de o derivado tiazolidínico LPSF/SF-25 apresentar melhor citotoxicidade, o mesmo apresentou atividade antiparasitária com os valores de IC₅₀ de 69,41 µM.

Derivados Tiazolidínicos	Citotoxicidade (µg/ml)	IC ₅₀ (µM)
LPSF/SF-03	1	ND
LPSF/SF-05	5	ND
LPSF/SF-20	25	ND
LPSF/SF-22	10	ND
LPSF/SF-25	25	69,41
PZQ	<1	76,82

Tabela 02: Resultados da citotoxicidade e da IC₅₀. ND são valores não determinados, pois não foi possível fazer a análise de regressão linear.

-Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* frente aos derivados tiazolidínicos

Na avaliação da atividade *in vitro* foi observado que os derivados tiazolidínicos LPSF/SF-22 (Figura 14) e LPSF/SF-25 (Figura 15) apresentaram uma melhor resposta frente aos vermes adultos do *S. mansoni*. Os parasitos observados obtiveram, no sexto dia, uma taxa de mortalidade de 78% e 86% respectivamente, na dose de 80 µg/mL. O grupo controle tratado com o PZQ (Figura 16) apresentou 100% de mortalidade quando submetido às mesmas doses testadas. A eficácia terapêutica dos derivados tiazolidínicos LPSF/SF-03 (Figura 17), LPSF/05 (Figura 18) e LPSF/20 (Figura 19) foi inferior, com baixa taxa de mortalidade dos vermes adultos, os quais apresentaram 20% na dose de 80 µg/mL; 33% na dose de 100 µg/mL e 54,5 % na dose de 80 µg/mL, respectivamente. Com exceção do LPSF/SF-05 que demonstrou melhor resposta na dose de 100 µg/mL, todos os demais derivados tiazolidínicos apresentaram maiores taxas de mortalidade na dose de 80 µg/mL. O fator predominante para esse resultado deve-se ao ponto de saturação dos derivados na presença do solvente utilizado, o dimetilsulfóxido (DMSO).

Os gráficos de cinética demonstrados a seguir relatam a taxa de mortalidade dos vermes adultos do *S. mansoni* nas concentrações preconizadas de todos os derivados tiazolidínicos (LPSF/SF) e do praziquantel:

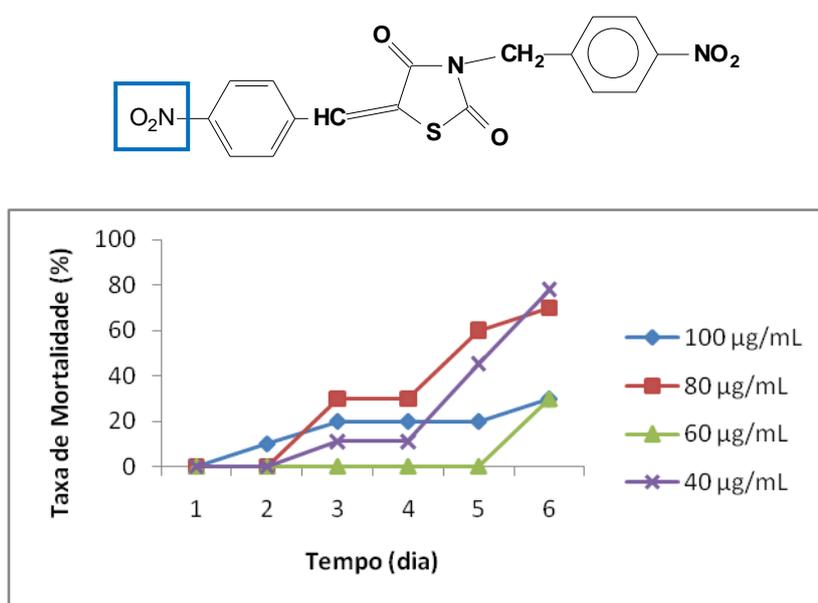


Figura 14: Cinética de mortalidade de vermes adultos do *S. mansoni* frente ao derivado tiazolidínico LPSF/SF-22.

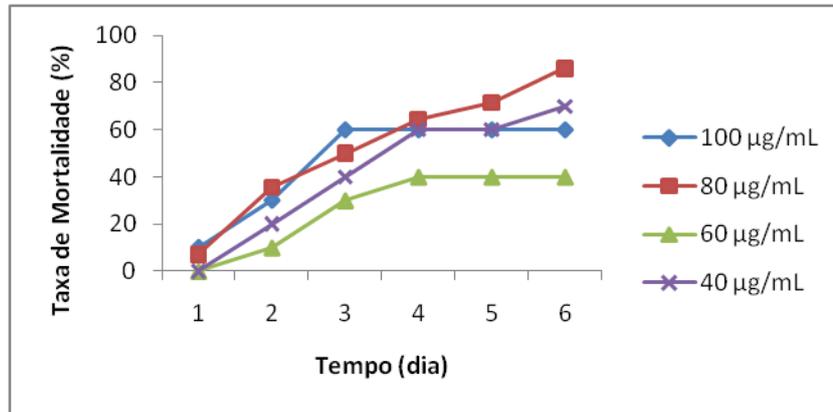
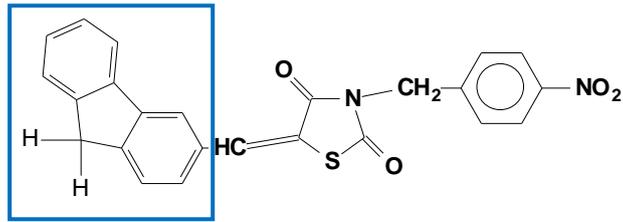


Figura 15: Cinética de mortalidade de vermes adultos do *S. mansoni* frente ao derivado tiazolidínico LPSF/SF-25.

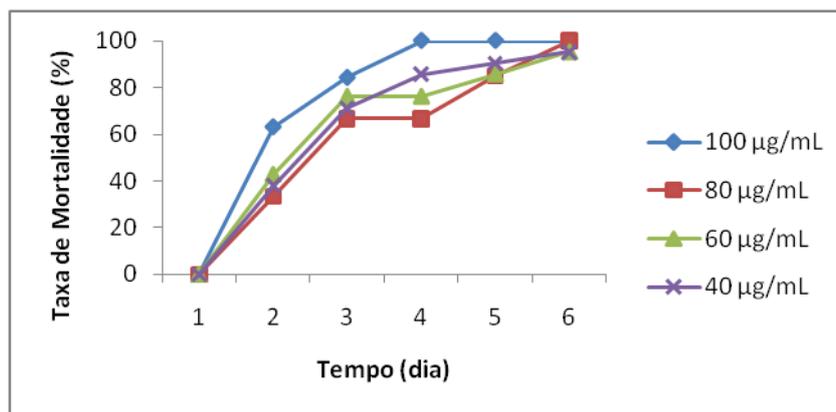
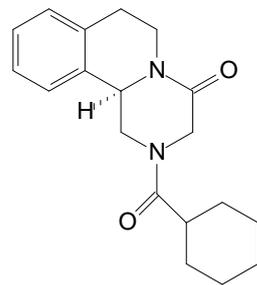


Figura 16: Cinética de mortalidade de vermes adultos do *S. mansoni* frente ao Praziquantel.

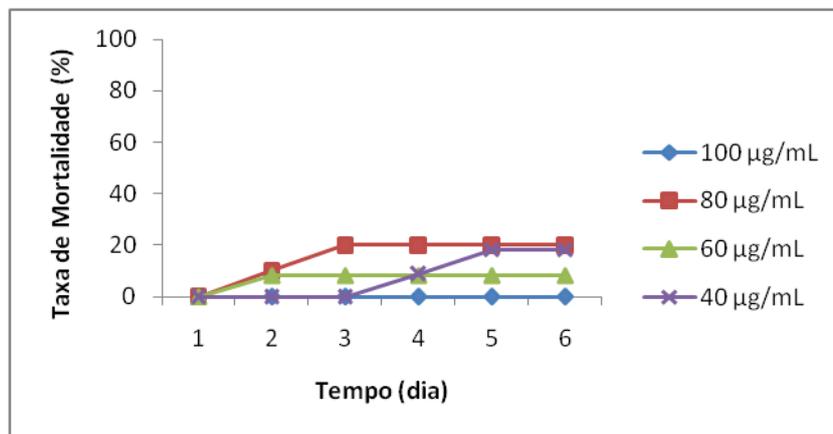
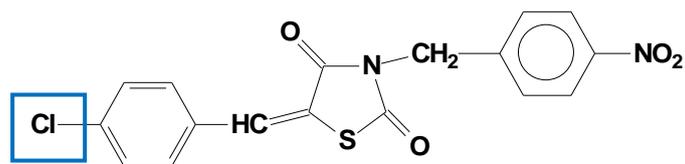


Figura 17: Cinética de mortalidade de vermes adultos do *S. mansoni* frente ao derivado tiazolidínico LPSF/SF-03.

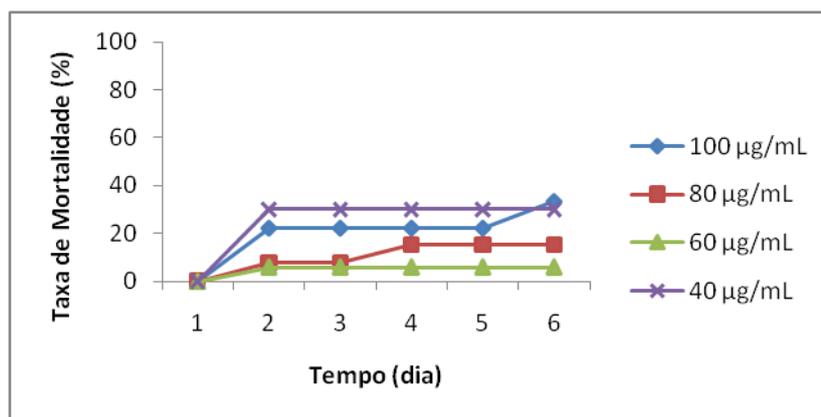
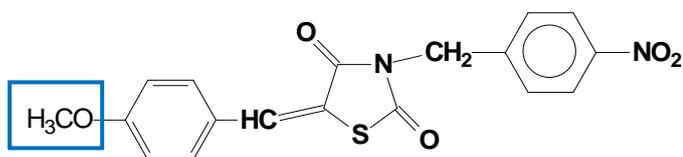


Figura 18: Cinética de mortalidade de vermes adultos do *S. mansoni* frente ao derivado tiazolidínico LPSF/SF-05.

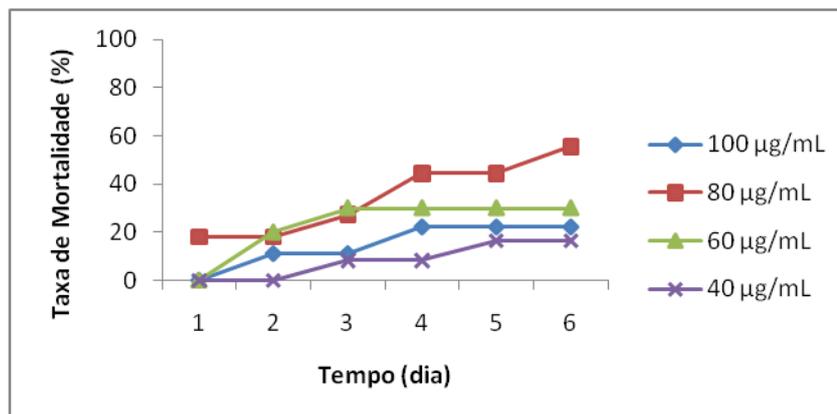
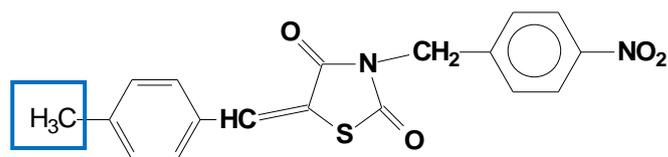


Figura 19: Cinética de mortalidade de vermes adultos do *S. mansoni* frente ao derivado tiazolidínico LPSF/SF-20.

Com relação à motilidade observada na atividade *in vitro* no sexto dia, último dia de experimento, cada verme foi analisado quanto aos seus movimentos:

- **Ativos:** movimento corporal normal do parasito;
- **Lentos:** diminuição do movimento corporal do parasito;
- **Muito lentos:** movimento corporal paralisado apresentando apenas movimentos cefálicos do parasito;
- **Sem movimentos:** ausência total de movimento corporal e cefálico do parasito.

Os derivados tiazolidínicos LPSF/SF-05, LPSF/SF-20, LPSF/SF-22 e LSPF/SF-25 causaram uma diminuição expressiva dos movimentos corporais dos vermes adultos do *S. mansoni* nas quatro doses testadas (100µg/mL, 80µg/mL, 60µg/mL e 40µg/mL). O LPSF/SF-03 foi responsável por uma menor atividade apresentando alguns vermes ativos na dose de 80µg/mL. O grupo controle testado com o PZQ apresentou, no último dia do experimento ausência total dos movimentos dos vermes adultos do *S. mansoni*. Os resultados obtidos da motilidade (%) dos vermes adultos do *S. mansoni* estão apresentados nas tabelas a seguir:

SF-22	Movimentos (%)			
Doses	Ativos	Lentos	Muito lentos	Mortos
100µg/mL	0	40	30	30
80 µg/mL	0	20	10	70
60 µg/mL	0	40	30	30
40 µg/mL	0	0	22,3	77,7

Tabela 03: Taxa de motilidade (%) dos vermes adultos do *S. mansoni* frente ao derivado tiazolidínico LPSF/SF-22.

SF-25	Movimentos (%)			
Doses	Ativos	Lentos	Muito lentos	Mortos
100µg/mL	0	10	30	60
80 µg/mL	0	0	14,3	85,7
60 µg/mL	0	20	40	40
40 µg/mL	0	10	20	70

Tabela 04: Taxa de motilidade (%) dos vermes adultos do *S. mansoni* frente ao derivado tiazolidínico LPSF/SF-25.

PZQ	Movimentos (%)			
Doses	Ativos	Lentos	Muito lentos	Mortos
100µg/mL	0	0	0	100
80 µg/mL	0	0	0	100
60 µg/mL	0	0	0	100
40 µg/mL	0	0	0	100

Tabela 05: Taxa de motilidade (%) dos vermes adultos do *S. mansoni* frente ao PZQ.

SF-03	Movimentos (%)			
Doses	Ativos	Lentos	Muito lentos	Mortos
100µg/mL	0	75	25	0
80 µg/mL	20	20	40	20
60 µg/mL	0	85	7	8
40 µg/mL	0	64	18	18

Tabela 06: Taxa de motilidade (%) dos vermes adultos do *S. mansoni* frente ao derivado tiazolidínico LPSF/SF-03.

SF-05	Movimentos (%)			
Doses	Ativos	Lentos	Muito lentos	Mortos
100µg/mL	0	22	44,7	33,3
80 µg/mL	0	38	38	24
60 µg/mL	0	18	76	6
40 µg/mL	0	20	50	30

Tabela 07: Taxa de motilidade (%) dos vermes adultos do *S. mansoni* frente ao derivado tiazolidínico LPSF/SF-05.

SF-20	Movimentos (%)			
Doses	Ativos	Lentos	Muito lentos	Mortos
100µg/mL	0	44	33	23
80 µg/mL	0	55,6	0	54,5
60 µg/mL	0	40	30	30
40 µg/mL	0	58	25	17

Tabela 08: Taxa de motilidade (%) dos vermes adultos do *S. mansoni* frente ao derivado tiazolidínico LPSF/SF-20.

-Avaliação da suscetibilidade *in vivo* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* frente aos derivados tiazolidínicos

Os resultados da citotoxicidade e da avaliação da suscetibilidade *in vitro* de vermes adultos de *S. mansoni* frente aos derivados tiazolidínicos apresentados anteriormente, mostra que LPSF/SF-25 foi o composto que melhor se destacou nas duas metodologias. Dessa forma, surgiu a necessidade da avaliação *in vivo* dos vermes adultos do *S. mansoni* frente a este derivado tiazolidínico. Esses resultados estão representados abaixo:

- **Número de vermes recuperados após realização da perfusão porta-hepática**

Na avaliação da atividade *in vivo*, os camundongos da espécie *Mus musculus* foram tratados durante cinco dias por via oral após 60 dias de infecção na fase aguda e após 15 dias do tratamento do composto tiazolidínico LPSF/SF-25 e do PZQ, os animais foram perfundidos para determinação do número de vermes adultos do *S. mansoni*. Foi observado uma redução do número de vermes no grupo II, na dose de 200 mg/Kg apresentando uma eficácia do tratamento de 28%. O grupo I com a dose de 25 mg/Kg não demonstrou nenhuma eficácia, apresentando o mesmo número de vermes recuperados do grupo controle negativo (grupo V). O grupo III e IV, representados pelo PZQ, demonstraram uma eficácia do tratamento de 100%, com nenhum verme recuperado após a perfusão dos camundongos (Tabela 09).

Grupo Experimental	Compostos	Doses Testadas	Vermes Recuperados	Eficácia
Grupo I	LPSF/SF-25	25 mg/Kg	32	0
Grupo II	LPSF/SF-25	200mg/Kg	23	28%
Grupo III	Praziquantel	25 mg/Kg	0	100
Grupo IV	Praziquantel	200 mg/Kg	0	100
Grupo V	Veículo + PEG	-	32	0

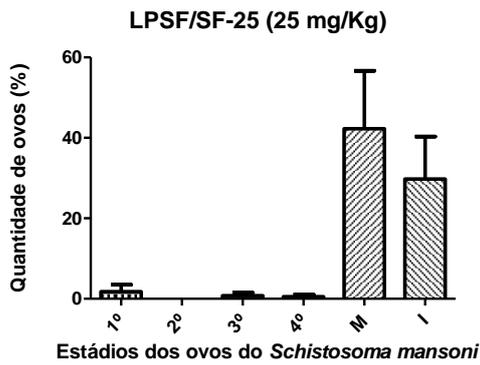
Tabela 09: Quantificação dos vermes recuperados no sistema porta hepático após 5 dias de tratamento com o SF-25.

- Oograma

Através da avaliação dos estádios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni* em fragmentos intestinais, verificou-se que os dois grupos tratados com o LPSF/SF-25, em doses consecutivas de 25 mg/Kg e 200 mg/Kg durante cinco dias por via oral apresentaram diminuição expressiva da percentagem dos estádios imaturos dos ovos do *S. mansoni*. O grupo I (LPSF/SF-25/25mg/Kg) (Figura 20, a) apresentou um baixo número de ovos nos estádios primário, terciário e quaternário, com ausência de ovos no estágio secundário. Ao mesmo tempo, houve um acréscimo de 65% e de 30% de ovos maduros e inviáveis, respectivamente. No grupo II (LPSF/SF-25/200mg/Kg) (Figura 20, b) houve ausência de ovos do estágio primário, com predominância mínima dos outros estádios e presença de 53,8% de ovos maduros e 42,6% inviáveis.

O grupo III (PZQ/25mg/Kg) (Figura 21, c) demonstrou um total de 82,7% de ovos maduros e 17,3% de ovos inviáveis. O grupo IV (PZQ/200mg/Kg) (Figura 21, d) apresentou um taxa de 71,6% e 28,4% ovos maduros e inviáveis, respectivamente. No grupo V (veículo + PEG) (Figura 22), grupo não tratado, houve a predominância de todos os estádios imaturos, maduros e alguns ovos inviáveis. Os ovos do *S. mansoni* foram classificados como ovos imaturos primários (1º), secundários (2º), terciários (3º), quaternários (4º); ovos maduros (M) e ovos inviáveis (I). A seguir, observa-se o oograma de cada grupo analisado:

a)



b)

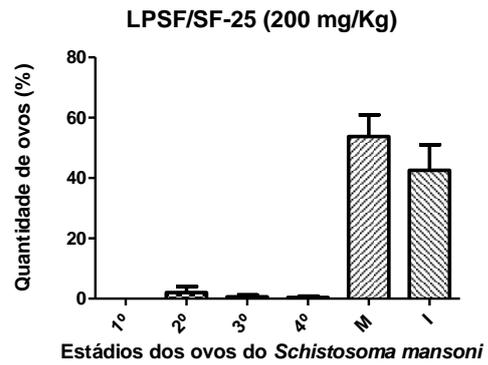
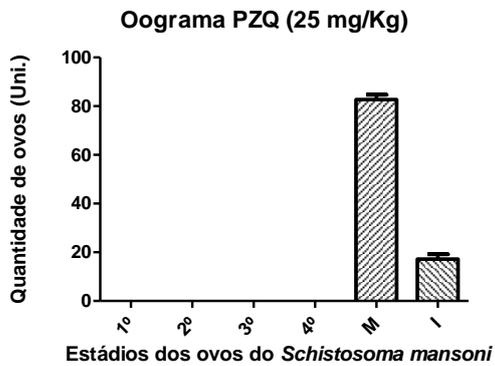


Figura 20: Oograma após exposição de camundongos ao LPSF/SF-25 nas doses de 25mg/Kg (a) e 200mg/Kg (b);

c)



d)

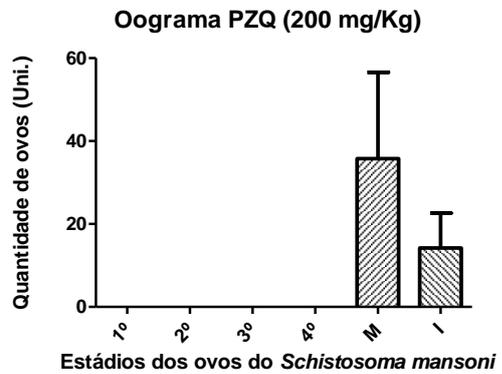


Figura 21: Oograma após exposição de camundongos ao PZQ nas doses de 25mg/Kg (c) e 200mg/Kg (d).

e)

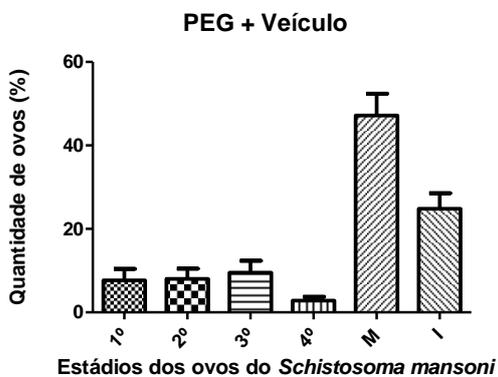


Figura 22: Oograma após exposição de camundongos ao PEG + Veículo (e).

7. DISCUSSÃO

A diferença do potencial terapêutico observada nos derivados tiazolidínicos testados frente aos vermes adultos do *S. mansoni* se deve principalmente aos diferentes radicais presentes nas estruturas químicas de cada composto. Partindo-se de um esqueleto estrutural tiazolidínico foram adicionados substituintes que são responsáveis pela variação da resposta biológica.

Os derivados tiazolidínicos possuem várias propriedades biológicas, tais como atividade anticonvulsivante, hipnótica, antihelmíntica, antibacteriana, anticâncer, antifúngica, anti-histamínica, antiviral, antiinflamatória (VERMA & SARAF, 2008), antifibrótica (KON, 2002), antidiabética, antiarterosclerose (PERGAL, 2005), antimicrobiana (BOZDAG-DUNGAR, 2007), e antiprotozoária (LIESEN, 2008).

O 3-metil-5-[(4-nitrofenil)azo] rodanina (Figura 23), também conhecido como nitrodan, é um derivado tiazolidínico caracterizado por apresentar uma potente atividade antihelmíntica, demonstrando eficácia quando administrado em camundongos infectados com *Himenolepsis nana* e *Siphacia obvelata* (GUIRE, O'NEIL & BRODY, 1966). Séries dos compostos tiazolidínicos, a 2-tiono-3-substituído-5-[(2-metil-4-nitrofenil) azo]-4-tiazolidinonas e a 2-tiono-3-metil-5-[(2,4-dinitrofenil)azo]-4-tiazolidinona também são considerados agentes anti-helmínticos ao mesmo tempo em que apresentam eficácia contra outras parasitoses (ARIES, 1974).

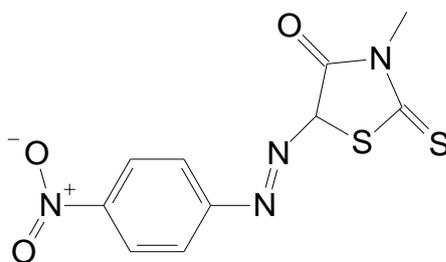


Figura 23: 3-metil-5-[(4-nitrofenil)azo] rodanina

Compostos bioisómeros das tiazolidinas conhecidos por imidazolidinas apresentam atividade antiparasitária, mais comumente se destacando como potenciais agentes esquistossomicidas sendo avaliados em estudos *in vitro* contra os vermes adultos do *Schistosoma mansoni*. Dentre os derivados imidazolidínicos destacam-se a 3-benzil-5-(4-cloro-arylazo)-4-tioxi-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT-5), que apresentou uma taxa de mortalidade de 100% dos vermes adultos após 24 horas com uma dose 58 μ Mol ao mesmo tempo em que causou alteração tegumentar no parasito. Estudos

posteriores sugerem que o papel da distribuição eletrônica do substituinte arilazo influenciou na resposta biológica causada ao parasito (PITTA, 2006).

Outros compostos imidazolidínicos testados na atividade esquistossomicida *in vitro* foram os RZS-2 (5-(4-cloro-benzilideno-3-(4-nitrobenzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona) e o RZS-5 (5-(4-fluorido-benzilideno-3-(4-nitrobenzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona). O RZS-2 apresentou 100% de mortalidade dos vermes adultos do *S. mansoni* na concentração de 640 μM no segundo dia de observação (48 horas) e o RZS-5, no primeiro dia do experimento (24 horas) apresentou um comportamento semelhante ao praziquantel, induzindo 100% de mortalidade dos vermes adultos do *S. mansoni* em todas as doses testadas (640 μM , 320 μM , 160 μM , 80 μM e 40 μM) (NEVES, 2010).

O derivado tiazolidínico LPSF/SF-25 (Figura 24, a), substituído pelo radical fluoreno destacou-se por apresentar a melhor atividade *in vitro* contra os vermes adultos do *S. mansoni* com uma taxa de motilidade reduzida expressiva e uma taxa de mortalidade de 85,7 na dose de 80 $\mu\text{g/mL}$ (0,19 μM) e 70% na dose de 40 $\mu\text{g/mL}$ (0,09 μM). O radical fluoreno está presente em um fármaco antiparasitário denominado lumefantrina, a 2-dibutilamino-1-[2,7-dicloro-9-(4-clorobenzilideno)-9H-fluoren-4-il]-etanol (Figura 24, b) (EZZET, 2000).

A lumefantrina quando combinada com o artemeter, dá origem a um antimalárico utilizado atualmente na indústria farmacêutica (PRENJI, 2009). A lumefantrina é um composto lipofílico (VALE, MOREIRA & GOMES, 2005), possui um mecanismo, ainda não totalmente elucidado, no qual envolve a inibição da síntese protéica e do ácido nucléico no parasito e está relacionado com a redução da extensão da parasitemia (MAKANGA, 2009).

As fêmeas do *Schistosoma mansoni* possuem a cor escura devido a hemozoína oriunda do processo digestivo do sangue (REY, 2008). A lumefantrina tem a capacidade de inibir a produção de hemozoína. Estudos sugerem que o sítio de ação antiparasitária da lumefantrina seja o vacúolo digestivo do parasito da malária, onde se acredita que a lumefantrina interfira na conversão do grupo heme, um intermediário considerado tóxico formado através do processo de degradação da hemoglobina ao pigmento malárico não tóxico denominado hemozoína. Há evidências através de experimentos *in vitro* que a interação entre a lumefantrina e o grupo heme esteja envolvida na toxicidade desse fármaco ao parasito e que esse composto tenha a capacidade de interferir na cristalização da hemozoína. No entanto, estes mecanismos ainda não foram comprovados (CUNICO, 2007).

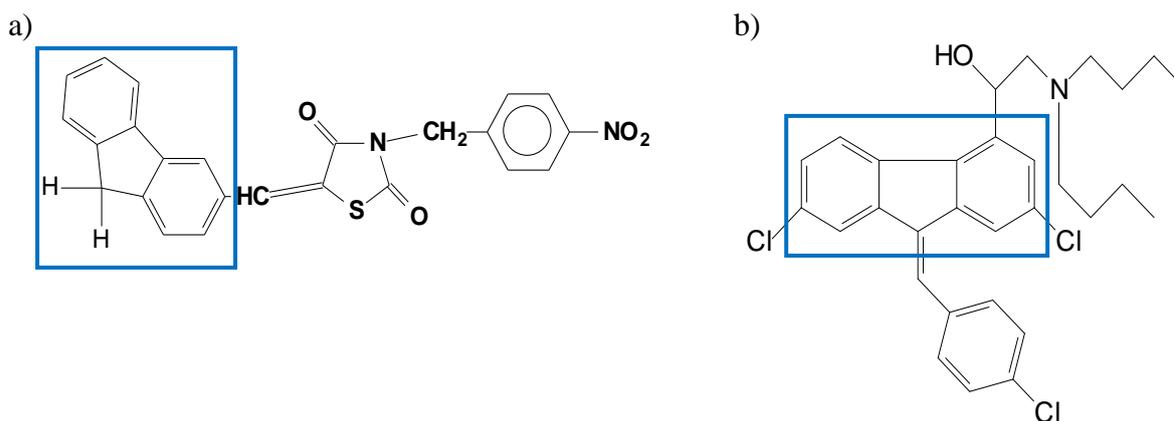


Figura 24: Similaridade entre o LPSF/SF-25 (a) e a lumefantrina (b).

Nos estudos *in vivo* com camundongos infectados com alta carga parasitária (120 cercárias) e tratados com o derivado tiazolidínico LPSF/SF-25, observou-se uma menor oviposição dos parasitos após administração do composto, uma vez que a quantidade de ovos maduros encontrados no intestino foi superior aos demais estádios evolutivos não havendo ovos em estágio primário na concentração de 200 mg/Kg e estágio secundário na concentração de 25 mg/Kg. A maior quantidade de ovos em estágio maduro deve-se a postura dos parasitos realizada anteriormente ao tratamento (FREZZA, 2007). Os dados apresentados na literatura demonstram uma alta variação no número de ovos obtidos por pares de vermes em estudos *in vitro* (SCHIRAZIAN, SCHILLER, 1983; EL RIDI, 1997) e *in vivo* (CHEEVER, 1994).

Embora os resultados tenham demonstrado alterações nos estádios evolutivos dos ovos, a redução do número de vermes foi de 28% na concentração máxima utilizada do composto. A eficácia da atividade esquistossomicida é considerada padrão quando o composto é capaz de gerar uma taxa de mortalidade superior a 80% (NWARA, 2006). A redução do número de vermes for inferior a 30%, a atividade é considerada de baixa eficácia (BOTROS, 2004). O composto parece influenciar na oviposição dos parasitos, uma vez que não se observou alterações no número de vermes entre os grupos estudados. Todavia, as alterações encontradas nos diferentes estádios dos ovos, apontam para a necessidade de maiores estudos sobre a fecundidade dos parasitos frente a esses compostos.

Dentre os derivados tiazolidínicos testados na atividade *in vitro*, o composto LPSF/SF-22 (Figura 25, a) substituído pelo grupamento nitro, apresentou a segunda melhor resposta, com uma taxa de mortalidade de 70% no último dia de observação na

dose de 80 µg/mL (0,21 µM). O LPSF/SF-22 também foi responsável por interferir na motilidade dos parasitos, apresentando ausência de vermes em seu estado normal ativo. Em trabalhos utilizando-se um isómero das tiazolidinas, um derivado imidazolidínico contendo o radical nitro, o 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (Figura 25, b), destacou-se nos trabalhos de Oliveira e colaboradores por apresentar efeito deletério máximo de 100% em 12 dias na dose de 120 µg/ mL na avaliação *in vitro* dos vermes adultos de *S. mansoni* ao final do último dia de experimento (OLIVEIRA, 2004).

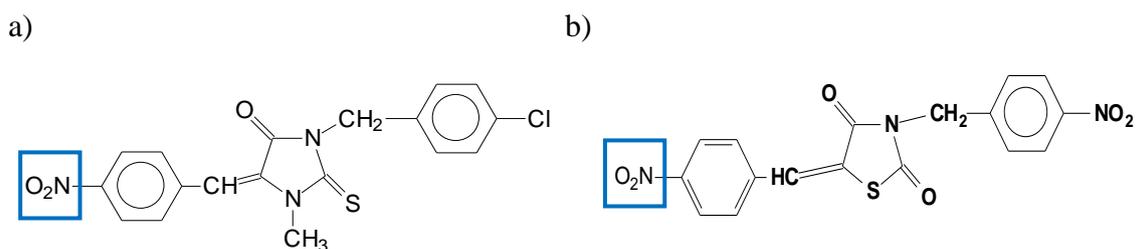


Figura 25: a) 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona; b) LPSF/SF-22.

O radical nitro é considerado parasitofórico por apresentar um grupo de nitroderivados auxiliando na atividade antiparasitária, tais como os furanos, tiofenos, tiazóis e imidazóis. O grupo nitro é facilmente reduzido a nível molecular por possuir um efeito indutivo negativo, apresentando devido a isso, um caráter fortemente acceptor de elétrons, ao mesmo tempo em que possui um efeito de ressonância entre o átomo de nitrogênio e os dois átomos de oxigênio presentes em sua estrutura (PAULA, SERRANO & TAVARES, 2009).

Muitos nitrocompostos vem se destacando na terapêutica como antiparasitários tais como o metronidazol, o tinidazol, o benzonidazol e o nirfurtimox, destacando-se por apresentar um processo de biorredução enzimática do grupo nitro como possível mecanismo de ação, resultando na formação de radicais livres com toxicidade prioritária para as células bacterianas e parasitárias (PAULA, SERRANO & TAVARES, 2009).

O possível mecanismo de ação do grupamento nitro está esquematizado na figura 26. Neste mecanismo também estão envolvidas a NADPH citocromo P450 redutase responsável pela formação de um radical nitro intermediário com subsequente formação de hidroxilamina (R-NHOH). Em seguida, o oxigênio molecular (O₂) é reduzido acarretando a formação do íon superóxido (O₂⁻) e regenerando o grupo NO₂

num processo conhecido como ciclo redox. (MAYA, 2007). Após sua formação, o íon superóxido é captado pela enzima superóxido dismutase gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que, através da reação de Haber-Weiss na presença de íons Fe^{III} , forma o radical hidroxila ($\cdot OH$), sendo este altamente tóxico para o parasito (DIAS, 2009).

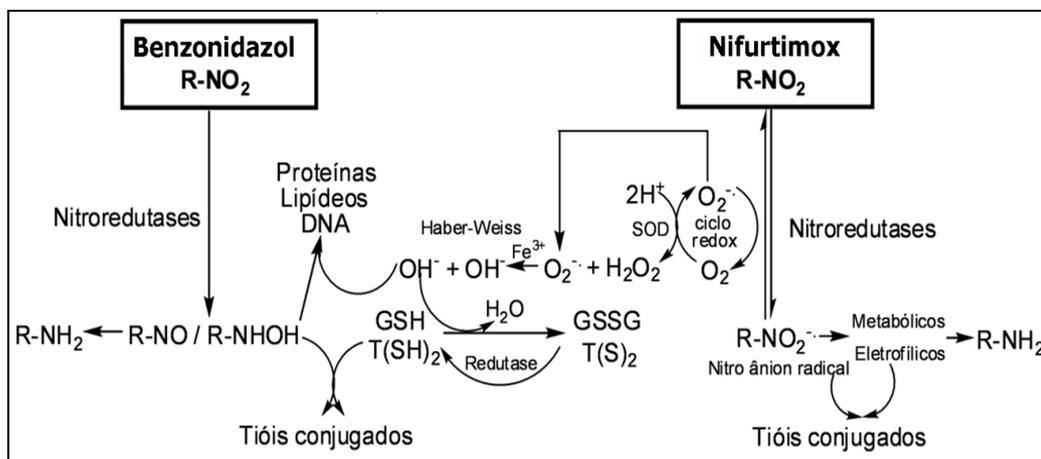


Figura 26: Mecanismo de ação do $R-NO_2$ (DIAS, 2009).

O derivado tiazolidínico LPSF/SF-20 (Figura 27, a), substituído pelo radical metila apresentou vermes adultos do *S. mansoni* com uma taxa de motilidade reduzida e uma taxa de mortalidade de 54,5 % na dose de 80 $\mu g/mL$ (0,22 μM). O radical metila apresenta efeito indutivo positivo com doação de elétrons. No entanto, devido à ausência do par de elétrons, o substituinte metila não apresenta efeito de ressonância (THOMAS, 2003).

O derivado 3-benzil-1-metil-5-(4-metil-benzilideno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/JT-63) (Figura 27, b) testado em trabalhos *in vitro* como potencial agente esquistossomicida apresentou uma taxa de mortalidade máxima de 100 % dos vermes adultos do *S. mansoni* na dose 644 μM no segundo dia de experimento (48 horas). No entanto, não demonstrou atividade esquistossomicida na dose de 80,5 μM apresentando ausência de letalidade durante todos os oito dias de observação no experimento (PITTA, 2006).

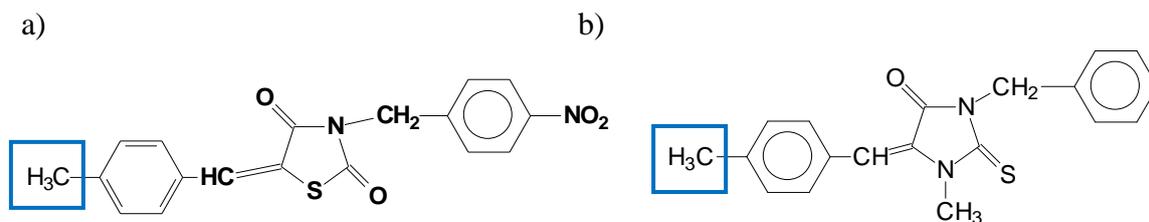


Figura 27: a) LPSF/SF-20; b) 3-benzil-1-metil-5-(4-metil-benzilideno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/JT-63)

A presença de um grupamento metila acarreta um aumento da lipofilicidade do composto, acarretando uma melhor penetração do mesmo através das membranas celulares. Porém, a natureza lipídica do composto pode diminuir a resposta da atividade biológica devido à redução da solubilidade em meio aquoso, bem como o aprisionamento do derivado nas membranas biológicas (THOMAS, 2003).

Outro problema relacionado ao aumento da lipofilicidade é o surgimento de micelas em torno do derivado com formação de agregados que impedem a ligação de seus sítios ativos aos seus receptores, ou seja, essa formação de micelas dificulta a interação fármaco-receptor (THOMAS, 2003). Provavelmente, fatores relacionados à lipofilicidade, podem ter influenciado no resultado da atividade do LPSF/SF-20 na avaliação da atividade *in vitro* frente aos vermes adultos do *Schistosoma mansoni*.

No derivado tiazolidínico LPSF/SF-05 (Figura 28, a), o substituinte presente em sua estrutura química é o metóxi, um radical que apresenta efeito indutivo positivo doador de elétrons. Segundo trabalhos realizados por Pitta e colaboradores (2006), o 3-benzil-1-metil-5-(4-metoxi-benzilideno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/JT-68) (Figura 28, b), um isómero da tiazolidina, apresentou atividade esquistosomicida na avaliação da suscetibilidade *in vitro* desse composto com uma taxa de mortalidade de 100% dose de 644 μMol no terceiro dia (72 horas) de contato com os vermes adultos do *S. mansoni*. No entanto, o LPSF/JT-68 não apresentou letalidade na dose de 80,5 μM aproximando-se dos resultados obtidos com o derivado LPSF/SF-05 que apresentou apenas 33% na dose de 80 $\mu\text{g/mL}$ (0,22 μM) no último dia de observação dos vermes adultos do *S. mansoni* (PITTA, 2006).

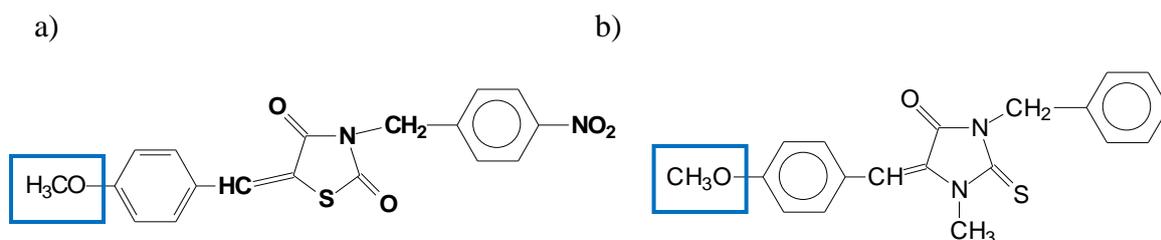


Figura 28: a) LPSF/SF-05; b) 3-Benzil-1-metil-5-(4-metóxi-benzilideno)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/JT-68)

O substituinte presente no derivado tiazolidínico LPSF/SF-03 é o radical cloro. O substituinte cloro possui um efeito indutivo negativo acceptor de elétrons. Isso acontece porque o átomo de cloro é mais eletronegativo que o carbono além de possuir um efeito doador de elétrons por ressonância (BRUICE, 2006). A incorporação desse halogênio como substituinte torna o derivado mais lipofílico e conseqüentemente, menos solúvel em água. Os halogênios tem a capacidade de melhorar a absorção dos derivados pelas membranas celulares, mas ao mesmo tempo, apresenta uma tendência indesejável aos fármacos halogenados de ficarem acumulados nos tecidos adiposos dos organismos tratados (THOMAS, 2003).

Possivelmente, a presença dos compostos halogenados na molécula pode ser uma explicação para o derivado tiazolidínico LPSF/SF-03 (Figura 29, a), que não apresentou atividade esquistossomicida significativa em nenhuma das quatro doses testadas, apresentando uma baixa eficácia com relação a taxa de motilidade com parasitos ativos e uma taxa de mortalidade de apenas 20% no último dia de observação dos vermes adultos do *S. mansoni* com a dose de 80 µg/mL (0,21 µM). O mesmo pode ter acontecido no composto 5-(4-bromo-benzilideno)-3-(4-cloro-fenacil)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona (LPSF/NN-140) (Figura 29, b) que apresenta os halogênios bromo e cloro em sua estrutura e não apresentou atividade esquistossomicida na atividade *in vitro* frente aos vermes adultos do *Schistosoma mansoni* não apresentando taxa de mortalidade na dose de 120 µg/mL corroborando com os resultados do derivado tiazolidínico LPSF/SF-03 (OLIVEIRA, 2004).

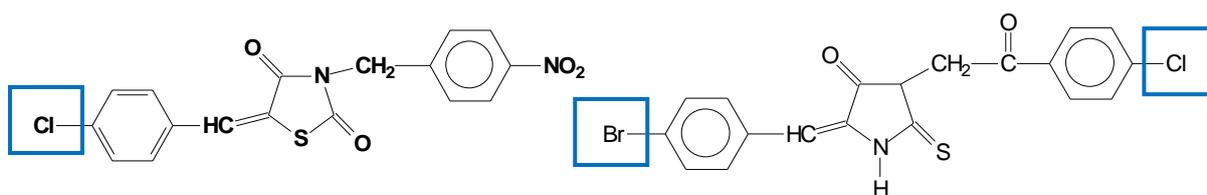


Figura 29: a) LPSF/SF-03; b) 5-(4-bromo-benzilideno)-3-(4-cloro-fenacil)-2-tioxiimidazolidin-4-ona (LPSF/NN-140)

Conclusão

8. CONCLUSÕES

- Nos ensaios de citotoxicidade, apesar de o derivado tiazolidínico LPSF/SF-20 não apresentar atividade *in vitro* significativa, o mesmo junto com o derivado LPSF/SF-25 demonstraram ser os compostos menos tóxicos, apresentando uma melhor concentração atóxica quando comparados aos outros derivados tiazolidínicos testados e o praziquantel;
- A partir dos resultados obtidos através da avaliação *in vitro* frente aos vermes adultos do *Schistosoma mansoni* foi possível concluir que dentre todos derivados tiazolidínicos testados, o LPSF/SF-22 e o LPSF/SF-25 podem ser apontados como potenciais alvos terapêuticos no tratamento da esquistossomose mansônica;
- Possivelmente, a baixa taxa de mortalidade dos vermes adultos do *Schistosoma mansoni* na avaliação *in vitro* com os derivados tiazolidínicos LPSF/SF-03, LPSF/SF-05 e LPSF/SF-20 deve-se a incorporação dos radicais no esqueleto estrutural dos compostos tiazolidínicos, através do aumento da lipofilicidade da molécula, acarretando uma diminuição da absorção desses compostos pelo parasito, interferindo, conseqüentemente, na interação fármaco-receptor;
- Na atividade *in vivo*, embora o derivado tiazolidínico testado LPSF/SF-25 tenha apresentado uma redução do número de vermes de 28% na concentração máxima utilizada, o oograma demonstrou alterações nos estádios evolutivos dos ovos, necessitando, dessa forma, de maiores estudos sobre a fecundidade dos parasitos frente a esses compostos.

Perspectivas

9. PERSPECTIVAS

- Avaliar a toxicidade aguda dos derivados tiazolidínicos LPSF/SF-25;
- Determinar a atividade *in vivo* dos derivados tiazolidínicos LPSF/SF-25 em camundongos infectados com *Schistosoma mansoni* na fase crônica;
- Quantificar, através de análises morfométricas, o grau de fibrose hepática nos camundongos esquistossomóticos na fase crônica tratados com o derivado tiazolidínico LPSF/SF-25;
- Propor um possível mecanismo de ação das tiazolidinas no processo fibrótico.

Referências Bibliográficas

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDUL-GHANI, R.A.; LOUTFY, N. & HASSAN, A. Experimentally promising antischistosomal drugs: a review of some drug candidates not reaching the clinical use. *Parasitol Res.* 105:899–906, 2009.
- ABDULLA, M.; LIM, K.; SAJID, M.; MCKERROW, J.H.; CAFFREY, C.R. Schistosomiasis *Mansoni*: Novel Chemotherapy Using a Cysteine Protease Inhibitor. *PLoS Medicine*. Volume 4. 2007.
- ALBUQUERQUE, M.C.A.; SILVA, T.G.; PITTA, M.G.R.; SILVA, A.C.A.; SILVA, P.G.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J.V.; WANDERLEY, A.G.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; BARBE, J.; PITTA, I.R. Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioxoimidazolidine compounds. *Pharmazie*, 60: 13-17, 2005.
- ALGER, H.M.; SAYED, A.A.; STADECKER, M.J.; WILLIAMS, D.L. Molecular and enzymatic characterisation of *Schistosoma mansoni* thioredoxin. *International Journal for Parasitology*. 32: 1285–1292, 2002.
- AMARAL, R. Personal communication, 2006.
- AMEMIYA, Y.; HONG, S.S.; VENKATARAMAN, B.V.; PATIL, P.N.; SHAMS, G.; ROMSTEDT, K.; FELLER, D.R.; HSU, F.L.; MILLER, D.D. Synthesis and alpha-adrenergic activities of 2- and 4-substituted imidazole analogues. *J. Med. Chem*, 35: 750-755, 1992.
- ANDRADE, Z. A. Schistosomiasis and hepatic fibrosis regression. *Acta Tropica*, 108: 79–82, 2008.
- ARIES R. French Patent, 2,186,245, 1974; *Chem. Abstr.* 81, 140869, 1974.
- ASHTON, P.D.; HARROP, R.; SHAH, B.; WILSON, R.A. The schistosome egg: development and secretions. *Parasitology*, 122: 329–38, 2001.
- BADR, S.G.E., PICA-MATTOCCIA, L., MORONI, R., ANGELICO, M., CIOLI, D. Effect of bile salts on oviposition *in vitro* by *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*. 85: 421-423, 1999.
- BARTH, L.R., FERNANDES, A.P.M., RIBEIRO-PAES, J.T., RODRIGUES, V. Effects of Goyazensolide during *in vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 92: 427-429, 1996.
- BECK, L.; VAN-LÜME D.S.M.; SOUZA, J.R.; DOMINGUES, A.L.C., FAVRE, T.; ABATH, F.G.C.; MONTENEGRO, S.M.L. Discriminating acute from chronic human *Schistosomiasis mansoni*. *Acta Tropica*, 108: 229–233, 2008.
- BLAIR, K.L.; BENNETT, J.L.; PAX, R.A., 1992. Praziquantel: physiological evidence for its site(s) of action in magnesium-paralysed *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 104: 59–66, 1992.

- BLANCHARD, T.J.; Schistosomiasis, Travel Medicine and Infectious Disease, 2, 5–11, 2004.
- BOTROS, S.; WILLIAM, S.; EBEID, F.; CIOLI, D.; KATZ, N.; DAY, T.A.; BENNETT, J.L. Lack of evidence for an antischistosomal activity of myrrh in experimental animals. Am. J. Trop. Med. Hyg., 71(2): 206-210, 2004.
- BOVENKAMP, M.V.; GROOTHUIS G.M.M.; MEIJER D.K.F.; OLINGA P., Liver fibrosis in vitro: Cell culture models and precision-cut liver slices, Toxicology *in Vitro*. 545-557, 2007.
- BOZDAG-DUNDAR, O.; OZGEN, O.; MENTESE, A.; ALTANLAR, N.; ATH, O.; KENDI, E.; ERTAN, R. Synthesis and antimicrobial activity of some new thiazolyl thiazolidine-2,4-dione derivatives. Bioorganic & Medicinal Chemistry, 15: 6012–6017, 2007.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Esquistossomose. Brasília, DF, 2006.
- BROWN, F. C.; Chem. Rev.61: 463, 1961.
- BRUICE, P.Y. Química Orgânica, 4ª Edição, 2006.
- BUEDING, E. Carbohydrate metabolism of *Schistosoma mansoni*. J. Gen. Physiol. 33: 475-495, 1950.
- CAFFREY, C.R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. Curr. Opin. Chem. Biol, 11: 433–439, 2007.
- CAFFREY, C.R. et al. Blood ‘n’ guts: an update on schistosome digestive peptidases. Trends parasitology, 20 (5): 241-248, 2004.
- CAFFREY, C.R.; SALTER, J.P.; LUCAS, K.D.; KHIEM, D.; HSIEH, I.; LIM, K.; RUPPEL, A.; MCKERROW, J.H.; SAJID, M. SmCB2, a novel tegumental cathepsin B from adult *Schistosoma mansoni*. Molecular & Biochemical Parasitology. 121: 49-61, 2002.
- CALDAS, I.R., CAMPI-AZEVEDO, A.C., OLIVEIRA, L.F.A., SILVEIRA, A.M.S., OLIVEIRA, R.C., GAZZINELLI, G.; Human *Schistosomiasis mansoni*: Immune responses during acute and chronic phases of the infection, Acta Tropica, 108: 109–117, 2008.
- CALDEIRA, R.L.; JANNOTTI-PASSOS, L.K.; CARVALHO, O.S.; Molecular epidemiology of Brazilian *Biomphalaria*: A review of the identification of species and the detection of infected snails; Acta Tropica; 1-6; 2009.
- CAPRON, A. Schistosomiasis: forty years’ war on the worm. Parasitol. Today, Oxford, v.14, n.10, p.379-384, 1998.

CASTILHO, M.S.; POSTIGO, M.P.; PEREIRA, H.M.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A.D. Structural basis for selective inhibition of purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni*: Kinetic and structural studies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18: 1421–1427, 2010.

CATTO, B. A.; TRACY, J. W.; WEBSTER, L. T. 1-Thiocarbamyl-2-imidazolidinone, a metabolite of niridazole in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 10: 111-120. 1984.

CHEEVER, A. W. Relative resistence of the eggs of human schistosomes to digestion in potassium hydroxide. *Bull. World Health Organ.*, 43:601-603, 1970.

CHEN, D.J.; FU, L.F.; SHAO, P.P.; WU, F.Z.; FAN, C.Z.; SHU, H.; REN, C.S.; SHENG, X.L. Studies on antischistosomal activity of qinghaosu in experimental therapy. *Zhong Hui Yi Xue Zha Zhi* (in Chinese), 80: 422–8, 1980.

CHRYSINA, E.D.; BOKOR, E.; ALEXACOU, K.; CHARAVGI, M.; OIKONOMAKOS, G.N.; ZOGRAPHOS, S.E.; LEONIDAS, D.D.; OIKONOMAKOS, N.G.; SOMSÁK, L. Amide-1,2,3-triazole bioisosterism: the glycogen phosphorylase case. *Tetrahedron: Asymmetry* 20: 733–740, 2009.

CIOLI, D.; BOTROS, S.S.; WHEATCROFT-FRANCKLOW, K.; MBAYE, A.; SOUTHGATE, V.; TCHUENTE, L.T.; PICA-MATTOCCIA, L.; TROIANI, A.R.; EL-DIN, S.H.S.; SABRA, A.A.; ALBIN, J.; ENGELS, D.; DOENHOFF, M.J. Determination of ED50 values for praziquantel in praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* isolates. *International Journal for Parasitology*, 34: 979–987, 2004.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present...and future? *Pharmac. Thu.* Vol. 68. 35-85, 1995.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Drug resistance in schistosomes. *Parasitology Today*. 9: 162-168, 1993.

COELHO, P.M.; PEREIRA, L.H.; DE MELLO, R.T. Antischistosomal activity of acridanone-hydrazones in *Cebus* monkeys experimentally infected with the SJ strain of *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 28:179–183, 1995.

COELHO, P.M.Z., ANDRADE, Z., MELLO, R.T., COSTA, G., DIAS, F.S.G., CUNHA-MELO, J.R.; Post-hepatectomy regeneration of the murine liver I. Effect upon *Schistosoma mansoni* lesions, before and after chemotherapy, *Acta Tropica*, 108: 104–108, 2008.

CONLON, C.P. *Schistosoma*. *Medicine*, 33: 8, 2005.

COON, D.R.; Schistosomiasis: Overview of the History, Biology, Clinicopathology, and Laboratory Diagnosis. *Clinical Microbiology Newsletter*, Vol. 27, N° 21, 2005.

COUTINHO, A. & BARRETO, F. T. Treatment of hepatosplenic schistosomiasis mansoni with niridazole: relationships among liver function, effective dose, and side effects. *Ann. NY Acad. Sci.* 160: 612-628, 1969.

CUNHA, A.S. Esquistossomose mansônica, São Paulo: Edusp, 1970.

CUNICO, W.; CARVALHO, S.A.; GOMES, C.R.B.; MARQUES, G.H. Fármacos antimalariais - história e perspectivas. *Rev. Bras. Farm.* 89(1): 49-55, 2008.

DAVIS, A.; BAILEY, D. R. Metrifonate in urinary schistosomiasis. *Bull. WHO* 41: 209-224, 1969.

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

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

DEMICHELL, C.; FRÉZARD, F. Antimônio no tratamento das zoonoses. *Cadernos temáticos de química nova na escola.* Nº 6, 2005.

DESAI, R.C.; HAN, W.; METZGER, E.J.; BERGMAN, J.P.; GRATALE, D.F.; MACNAUL, K.L.; BERGER, J.P.; DOEBBER, T.W.; LEUNG, K.; MOLLER, D.E.; HECK, J.V.; SAHOO, S.P. 5-Aryl Thiazolidine-2,4-diones: Discovery of PPAR Dual α/γ Agonists as Antidiabetic Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 13: 2795-2798, 2003.

DESPRÈS, L.; IMBERT-ESTABLET, D.; MONNEROT, M. Molecular characterization of mitochondrial DNA provides evidence for the recent introduction of *Schistosoma mansoni* into America. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 60: 221-229, 1993.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A.; SILVA, J. J. N., THIEMANN, O. H., OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos *Quim. Nova*, Vol. XY, No. 00, 1-14, 2009.

DIAS, L.C.S.; RIBEIRO, O.B. *Schistosoma mansoni*: eggs with two miracidia. *Transactions of the Royal society of tropical medicine and hygiene*, 74: 826, 1980.

DOENHOFF, M. J.; HAGAN, P.; CIOLI, D.; SOUTHGATE, V.; PICA-MATTOCCIA, L.; BOTROS, S.; COLES, S.; TCHUEM TCHUENTE, L.A.; MBAYE, A.; ENGELS, D. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. *Parasitology*, 136: 1825-1835, 2009.

DOENHOFF, M.J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 21:659-667, 2008.

- DOENHOFF, M.J.; SABAH, A.A.A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; BAIN, J. Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. *Transactions of the royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 81: 947-951, 1987.
- DOMINGUES, A. L. C.; BARRETO, V. S. T. Esquistossomose hepática. In: Matos, A. A.; Dantas, W. Conferência de Hepatologia, São Paulo: Fundo Editorial Byk, 391-405, 2001.
- DUVALL RH, DEWITT WB. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* v.16: p. 483-486, 1967.
- EDITORIAL ARAB. Antischistosomal therapy: Current status and recent developments. *Arab Journal of Gastroenterology*, 10: 1–3, 2009.
- EL SAYED, M.K.; BARAKAT, R.; FARGHALY, A.; EL BADWAY, A.; SOLIMAN, N.K.; HUSEIN, M.H.; MILLER, F.D. The impact of passive chemotherapy on *Schistosoma mansoni* prevalence and intensity of infection in the Egyptian Nile Delta. *Am. J. Trop.Med.Hyg*, 57: 266–271, 1997.
- ELLIOTT, D.E. Schistosomiasis Pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Parasitic diseases of the liver and intestines*, volume 25, 1996.
- ESHETE, F.; BENNETT, J.L.; *Schistosoma mansoni*: biochemical characteristics of the antischistosomal effects of Ro 15–5458. *Exp Parasitol*. 71:69–80, 1990.
- EZZET F.; VUGT, M.V.; NOSTEN, F.; LOOAREESUWAN, S.; . WHITE, N.J, *Ant. Agent. Chemoth*. 44: 697, 2000.
- FALLON, P.G. *Schistosome* resistance to praziquantel. *Drug Resistance Updates*, 1: 236-241, 1998.
- FALLON, P.G.; STURROCK, R.F.; NIANG, C.M.; DOENHOFF, M.J. Diminished susceptibility to praziquantel in a Senegal isolate of *Schistosoma mansoni*. *Am J Trop Med Hyg*. 53:61–2, 1995.
- FERRARI, M.L.A.; COELHO, P.M.Z.; ANTUNES, C.M.F.; TAVARES, C.A.P.; CUNHA, A.S. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in schistosomiasis mansoni treatment: a controlled trial. *Bull.World Health Org*, 81: 190–196, 2003.
- FERRARI, T.C.A.; MOREIRA, P.R.R.; CUNHA, A.S. Clinical characterization of neuroschistosomiasis due to *Schistosoma mansoni* and its treatment. *Acta Tropica*, 108: 89–97, 2008.
- FETTERER, R.H.; PAX, R.A.; BENNETT, J.L. Praziquantel, potassium and 2,4-dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*. *Eur. J. Pharmacol*. 64: 31–38, 1980.

- FILES, V.S. A study of the vector-parasite relationships in *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*, 41: 264-269, 1951.
- FILHO, R.P.; SILVEIRA, M.A.B. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. vol. 37, 2001.
- FIOCRUZ, *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose, uma visão multidisciplinar. 2008.
- FREZZA, T.F.; MADI, R.R.; BANIN, T.M.; PINTO, M.C.; SOUZA, A.L.R.; GREMIÃO, M.P.D.; ALLEGRETTI, S.M. Efeito do praziquantel incorporado a lipossomas nos diferentes estágios de desenvolvimento dos ovos de *Schistosoma mansoni*. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.*, v. 28, n.2, p.209-214, 2007.
- FRIED, B. An overview of the biology of trematodes. In: FRIED, B. & GRACZYK, T.K. *Advances in Trematode biology*, New York, Boca Raton: CRC Press, 1997.
- GÓES, A.J.S.; LIMA, W.T.; NAGY, H.J.; ALVES, A.J.; FARIA, A.R.; LIMA, J.G.; MAIA, M.B.S. Síntese e atividade antiedematogênica de derivados n-triptofil-5-benzilideno-2,4-tiazolidinadiona e n-triptofil-5-benzilideno-rodanina. *Quim. Nova*, Vol. 27, No. 6, 905-910, 2004.
- GREENBERG, R.M.; Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action?; *International Journal for Parasitology*, 35: 1–9, 2005.
- GROMER, S.; URIG, S.; BECKER, K. The thioredoxin system—From science to clinic. *Med Res Rev*. 24: 40–89, 2004.
- GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L.; Human schistosomiasis. *Lancet*, 368: 1106–18, 2006.
- GUIRE, W.C.; O'NEIL, R.C.; BRODY, G. J. *Paracytol*. 52, 1966.
- HOCKLEY, D.J. Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma mansoni*. *Advances in Parasitology*, 11: 233-305, 1973.
- HOMEIDA, M.A. et al. Association of the therapeutic activity of praziquantel with the reversal of Symmers' fibrosis induced by *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 45: 360-365, 1991.
- ISMAIL, M.; METWALLY, A.; FARGHLY, A.; BRUCE, J.; TAO, L. F.; BENNETT, J. L. Characterization of isolates of *S. mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. *American Journal Tropical Medicine and Hygiene*, 55: 214–218, 1996.
- JEZIORSKI, M.C. & GREENBERG, R.M. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: Potential role in praziquantel action. *International Journal for Parasitology*. 36: 625–632, 2006.

- KAPP, K.; KNOBLOCH, J.; SCHUSSLER, P.; SROKA, S.; LAMMERS, R.; KUNZ, W.; GREVELDING, C.G. The *Schistosoma mansoni* Src kinase TK3 is expressed in the gonads and likely involved in cytoskeletal organization. *Mol. Biochem. Parasitol.* 138: 171–182, 2004.
- KATZ, N. Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni. *Schistosoma mansoni e Esquistossomose, uma visão multidisciplinar*. Cap. 28, 2008.
- KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para esquistossomose mansoni, *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.32, n.6, p.705-711, 1999.
- KATZ, N. The discovery of *Schistosomiasis mansoni* in Brazil. *Gazeta Médica da Bahia*, 78 (2): 123-125, 2008.
- KATZ, N., CHAVES, A., PELLEGRINO, J. A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 14: 397-400, 1972.
- KATZ, N., The discovery of *Schistosomiasis mansoni* in Brazil, *Acta Tropica*, 69-71, 2008.
- KATZ, N.; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Cienc. Cult.* [online], v. 55, n. 1, pp. 38-43, 2003.
- KATZ, N.; COELHO, P.M.Z. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The Brazilian contribution. *Acta Tropica*, 108: 72–78, 2008.
- KNOBLOCH, J.; KUNZ, W.; GREVELDING, C.G. Herbimycin A suppresses mitotic activity and egg production of female *Schistosoma mansoni*. *International Journal for Parasitology*. 36: 1261–1272, 2006.
- KNOBLOCH, J.; WINNEN, R.; QUACK, M.; KUNZ, W.; GREVELDING, C.G. A novel Syk-family tyrosine kinase from *Schistosoma mansoni* which is preferentially transcribed in reproductive organs. *Gene*. 294: 87–97, 2002a.
- KON, K.; IKEJIMA, K.; HIROSE, M.; YOSHIKAWA, M.; ENOMOTO, N.; KITAMURA, T.; TAKEI, Y.; SATO, N. Pioglitazone Prevents Early-Phase Hepatic Fibrogenesis Caused by Carbon Tetrachloride. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 291: 55–61, 2002.
- KOTA, B.P.; HUANG, T.H.; ROUFOGALIS, B.D. An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacological Research*. 51: 85–94, 2005.
- KOUNI, M.H. Potential chemotherapeutic targets in the purine metabolism of parasites. *Pharmacology & Therapeutics*. 99: 283–309, 2003.
- KUNTZ, A.N.; DAVIOUD-CHARVET, E.; SAYED, A.A.; CALIFF, L.L.; DESSOLIN, J.; ARNÉR, E.S.J.; WILLIAMS, D.L. Thioredoxin Glutathione Reductase from *Schistosoma mansoni*: An Essential Parasite Enzyme and a Key Drug Target. Volume 4, 2007.

LAMBERTUCCI, J.R., SERUFO, J.C., GERSPACHER-LARA, R., RAYES, A.A.M., TEIXEIRA, R., NOBRE, V., ANTUNES, C.M.F., *Schistosoma mansoni*: assessment of morbidity before and after control. *Acta Tropica*. 77: 101–109, 2000.

LAMBERTUCCI, J.R.; SILVA, L.C.S., ANDRADE, L.M., QUEIROZ, L.C., CARVALHO, V.T., VOIETA, I., ANTUNESA, C.M., Imaging techniques in the evaluation of morbidity in schistosomiasis mansoni. *Acta Tropica*, 108: 209–217, 2008.

LANGMUIR, I. Isomorphism, isosterism and covalence. *J. Am. Chem. Soc.* 41: 1943–1559, 1909.

LE, W.; YOU, J.; YANG, Y. Studies on the efficacy of artemether in experimental schistosomiasis. *Acta Pharm Sin*, 17:187-93, 1982.

LIANGA, YOU-SHENG; COLESA, G.C.; DOENHOFFC, M.J.; SOUTHGATED V.R., In vitro responses of praziquantel-resistant and –susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel, *International Journal for Parasitology*, 31: 1227±1235, 2001.

LIESEN, A.P.; AQUINO, T.M.; GÓES, A.J.S.; LIMA, J.G.; FARIA, A.R.; ALVES, A.J. Métodos de obtenção, reatividade e importância biológica de 4-tiazolidinonas. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 2, 369-376, 2008.

LUTZ, A. Caramujos de água doce do gênero *Planorbis*, observados no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 10: 65-82, 1918.

MAIR, G.R. et al. Muscling in on parasitic flatworms. *Parasitology today*, 14: 73-76, 1998.

MAKANGA, M.; KRUDSOOD, S. The clinical efficacy of artemether/lumefantrine (Coartem®). *Malaria Journal*, 8, 2009.

MANSON, P. Report of a case of bilharzia from the West Indies. *Br. Med. J.* 2: 1894–1895. 1902.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A., *Comp. Biochem. Phys. Part A*, 146: 601, 2007.

McMANUS, D. P. The search for a vaccine against schistosomiasis: a difficult path but an achievable. *Immunol. Rev.*, Copenhagen, v.171, p.149-161, 1999.

MELMAN, S.D.; STEINAUER, M.L.; CUNNINGHAM, C.; KUBATKO, L.S.; MWANGI, I.N.; BARKER, N.W; MUTUKU, M.W.; KARANJA, D.M.S.; COLLEY, D.G.; BLACK, C.L.; SECOR, W.E.; MKOJI, G.M.; LOKER, E.S. Reduced Susceptibility to Praziquantel among Naturally Occurring Kenyan Isolates of *Schistosoma mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis* 3(8): e504, 2009.

MENDONÇA-SILVA, D.L. et al. Characterization of a GABAergic neurotransmission in adult *Schistosoma mansoni*. *Parasitology*. 129 (2): 1-10, 2004.

MEYER, F.; MEYER, H. & BUEDING, E. Lipid metabolism in the parasitic and free-living flat worms *Schistosoma mansoni* and *Dugesia dorotocephala*. *Biochimica et Biophysica Acta*. 21: 257-266, 1970.

MICHEL, A.; KNOBLOCH, J. E KUNZ, W. P19: a female and tissue specifically expressed gene in *Schistosoma mansoni*, regulated by pairing with the male. *Parasitology*, 127: 519-524, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica, 6º Edição, 2005.

MUDDU, A.K.; GUHA, I.N.; ELSHARKAWY, A.M.; et al. Resolving fibrosis in the diseased liver: translating the scientific promise to the clinic. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(4): 695–714, 2007.

NEGHINA, R.; NEGHINA, A.M.; MERKLER, C.; MARINCU, I.; MOLDOVAN, R.; IACOBICIU, I. Intestinal schistosomiasis, importation of a neglected tropical disease in Romania. Case report of a traveler to endemic regions. *Travel Medicine and Infectious Disease*, 7: 49-51, 2009.

NEVES, J.K.A.L.; BOTELHO, S.P.S.; MELO, C.M.L.; PEREIRA, V.R.A.; LIMA, M.C.A.; PITTA, I.R.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; GALDINO, S.L. Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Res*. DOI 10.1007/s00436-010-1886-y, 2010.

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

OLIVEIRA, M.F. et al. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. *Molecular and biochemical parasitology*, 111: 217-221, 2000.

OLIVEIRA, S.M.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; PITTA, M.G.R.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J.V.; LIMA, M.C.A.; PITTA, I.R.; GALDINO, S.L. A Resposta do *Schistosoma mansoni* Mantido *In Vitro* frente a Derivados Imidazolidinônicos. *Acta Farm. Bonaerense* 23 (3): 343-8, 2004.

OLIVEIRA, S.M.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A.; PITTA, M.G.R.; MALAGUEÑO, E.; OLIVEIRA, S.M.; SILVA, J.B.P.; HERNANDES, M.Z.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R. Estrutura, reatividade e propriedades biológicas de hidantoínas. *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 3, 614-622, 2008.

OSADA, Y.; SHIMIZU, S.; KUMAGAI, T.; YAMADA, S.; KANAZAWA, T.; *Schistosoma mansoni* infection reduces severity of collagen-induced arthritis via down-regulation of pro-inflammatory mediators; *International Journal for Parasitology*; 457–464; 2009.

PARISE FILHO, R.; SILVEIRA, M.A.B.; Panorama atual da esquistossomíase no mundo; *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 37, n. 2, maio/ago., 2001.

PAULA, F.R.; SERRANO, S.H.P.; TAVARES, L.C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. *Quim. Nova*, Vol. 32, No. 4, 1013-1020, 2009.

PATANI, G. A.; LAVOIE, E. J. *Chem. Rev.* 1996, 96, 3147–3176.

PEARCE, E.J.; MACDONALD, A.S. The immunobiology of Schistosomiasis. *Nature*, Volume 2, 2002.

PELLEGRINO, J. & J. FARIA. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 14: 363-9, 1965.

PENG, G.W.; MARQUEZ, V.E.; DRISCOLL, J.S. Potential central nervous system antitumor agents. Hydantoin derivatives. *J. Med. Chem.*, 18: 846-849, 1975.

PEREIRA, V. R. A.; LORENA, V. M. B.; GALVÃO DA SILVA, A. P.; COUTINHO, E. M.; SILVA, E. D.; FERREIRA, A. G. P.; MIRANDA, P.; KRIEGER, M. A.; GOLDENBERG, S.; SOARES, M. B. P.; CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, Y. Immunization with cytoplasmic repetitive antigen and flagellar repetitive antigen of *Trypanosoma cruzi* stimulates a cellular immune response in mice. *Parasitol* 129:563-570, 2004.

PEREIRA, H.D.; FRANCO, G.R.; CLEASBY, A.; GARRATT, R.C.; Structures for the potential drug target purine nucleoside phosphorylase from *Schistosoma mansoni* causal agent of Schistosomiasis. *J. Mol. Biol.* 353: 584–599, 2005.

PEREIRA, H.M.; BERDINI, V.; FERRI, M.R.; CLEASBY, A.; GARRATTA, R.C. Crystal structure of *Schistosoma* purine nucleoside phosphorylase complexed with a novel monocyclic inhibitor. *Acta Tropica*. 114: 97–102, 2010.

PERGAL, K.; PERGAL, M.; CSANADI, J.; DJOKOVIC, D. Synthesis of 5-arylidene-3-(4'-bromobenzyl) Thiazolidine-2,4-diones. *Chemistry of Heterocyclic Compounds*, Vol. 41, No. 12, 2005.

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

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

PINK, R.; HUDSON, A.; MOURIÈS, M.; BENDIG, M. Opportunities and Challenges in antiparasitic drug discovery. *Nature Reviews/ drug discovery*. Volume 04. 2005.

PITTA, M.G.R.; SILVA, A.C.A.; NEVES, J.K.A.L.; SILVA, P.G.; IRMÃO, J.I.; MALAGUEÑO, E.; SANTANA, J.V.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; ALBUQUERQUE, M.C.P.A. New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 101(Suppl. I): 313-316, 2006.

- PORDEUS, L.C.; AGUIAR, L.R.; QUININO, L.R.M.; BARBOSA, C.S. The Occurrence of Acute and Chronic Forms of the Schistossomiais Mansonic in Brazil from 1997 to 2006: A Revision of Literature. *Epidemiol. Serv. Saúde*, Brasília, 17(3):163-175, 2008.
- PRATA, A.; Comemoração do centenário da descoberta do *Schistosoma mansoni* no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 41(6):689-691, nov-dez, 2008.
- PREMJI, Z.G. Coartem®: the journey to the clinic. *Malaria Journal*, 8, 2009.
- RABELO, A.; PONTES, L.A.; ENK, M.J.; MONTENEGRO, S.M.L.; MORAIS, C.N. L. Diagnóstico parasitológico, imunológico e molecular da esquistossomose mansoni. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose, uma visão multidisciplinar. Cap. 31, 2008.
- RACCHI, M.; MAZZUCHELLI, M.; PORRELLO, E.; LANNI, C.; GOVONI, S. Acetylcholinesterase inhibitors: novel activities of old molecules. *Pharmacological Research*, 50: 441–451, 2004.
- RAMAASWAMY, K.; KUMAR, P. & HE, Y.X. A role for parasite-induced PGE2 in IL-10-mediated host immunoregulation by skin stage schistosomula os *Schistosoma mansoni*. *Journal of Immunology*. 165: 4.567-4.574, 2000.
- REY, L. *Parasitologia* 3ªed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2001.
- REY, L. *Parasitologia* 6ª ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2008.
- RICHTER, J. The impact of chemotherapy on morbidity due to schistosomiasis. *Acta Trop.*, 86: 161–183, 2003.
- RONKETTI, F.; RAMANA, A.V., CHAO-MING, X.; PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D.; TODD, M.H.; Praziquantel derivatives I: Modification of the aromatic ring, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17: 4154–4157, 2007.
- ROSS, A.G.; VICKERS, D.; OLDS, G.R.; SHAH, S.M.; MCMANUS, D.P.; Katayama syndrome. *Lancet Infect. Dis.*, 7: 218–224, 2007.
- RUMJANEK, F.D.; CALDAS, I.R.; GAZZINELLI, G. Bioquímica do *Schistosoma*. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomose, uma visão multidisciplinar. Cap. 5, 2008.
- SACONATO, H.; ATALLAH, A.; Interventions for treating Schistosomiasi mansoni. *Cochrane Data Sys. Rev.* 2, 2000.
- SAJID, M. & McKERROW, J.H. Cysteine proteases of parasitic organisms. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 120: 1–21, 2002
- SAMBON, L.W. Newor little known African Entozoa. *J. Trop. Med. Hyg.* 10: 117. 1907a.

- SAMBON, L.W. Remarks on *Schistosoma mansoni*. J. Trop. Med. Hyg. 10: 303–304. 1907b.
- SANTANA, J.V.; LIMA, M.C.A.; PITTA, I.R.; GALDINO, S.L. A resposta do *Schistosoma mansoni* mantido *in vitro* frente a derivados imidazolidinônicos. Acta Farm Bonaerense, 23: 343-348, 2004.
- SAYED, A.A.; SIMEONOV, A.; THOMAS, C.J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C.P.; WILLIAMS, D.L. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. Nature Medicine, volume 14, 2008.
- SCHNACK, F. J. et al. Enteropatógenos associados com diarreia infantil (< 5 anos de idade) em amostra da população da área metropolitana de Criciúma, Santa Catarina, Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 19, n. 4, p. 1205-1208, 2003.
- SHU-HUA, X. Development of antischistosomal drugs in China, with particular consideration to praziquantel and the artemisinins. Acta Tropica, 96: 153–167, 2005.
- SHUHUA, X.; BINGGUI, S.; CHOLLET, J.; TANNER, M. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with praziquantel enantiomers. Acta Tropica 76: 107–117, 2000.
- SHUHUA, X.; BINGGUI, S.; UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; TANNER, M. Transmission electron microscopic observations on ultrastructural damage in juvenile *Schistosoma mansoni* caused by artemether. Acta Tropica, 81: 53–61, 2002.
- SHUHUA, X.; JIQING, Y.; JINYING, M.; HUIFANG, G.; PEIYING, J.; TANNER, M. Effect of praziquantel together with artemether on *Schistosoma japonicum* parasites of different ages in rabbits. Parasitology International, 49: 25-30, 2000.
- SIEBOLD, C.T.; Ein Beitrag zur Helminthografia humana, aus brieflichen Mittheilungen des Dr. Bilharz in Cairo, nebst Bemerkungen von Prof. C. Th. V. Siebold in Breslau. Zeitschrift fur wissenschaftlich zoologie, 4: 53-76, 1852.
- SILVA, L.C.; CHIEFFI, P.P.; CARRILHO, F.J.; Schistosomiasis mansoni – Clinical Features; Gastroenterol Hepatol; 28(1):30-92; 2005.
- SILVEIRA, N.J.F.; UCHÔA, H.B.; CANDURI, F.; PEREIRA, J.H.; CAMERA JR., J.C.; BASSO, L.A.; PALMA, M.S.; SANTOS, D.S.; AZEVEDO JR, W.F. Structural bioinformatics study of PNP from *Schistosoma mansoni*. Biochemical and Biophysical Research Communications. 322: 100–104, 2004.
- STANLEY, R.G.; JACKSONC, C.L.; GRIFFITHSD, K.; DOENHOFF, M.J., Effects of *Schistosoma mansoni* worms and eggs on circulating cholesterol and liver lipids in mice, Atherosclerosis xxx (2009) xxx–xxx
- STEINAUER, M.L. The sex lives of parasites: Investigating the mating system and mechanisms of sexual selection of the human pathogen *Schistosoma mansoni*. International Journal for Parasitology, 39: 1157–1163, 2009.

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

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

SU, J.J.; MANSOUR, J.M.; MANSOUR, T.E. Purification, kinetics and inhibition by antimonials of recombinant phosphofructokinase from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 81: 171-178, 1996.

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

TEMPONE, A.J. et al. Dolichol phosphate mannose synthase is differentially expressed in male and female worms of *Schistosoma mansoni*. *Comparative Biochemistry and Physiology B*, 131: 465-474, 2002.

TEMPONE, A.J.; BIANCONI, M.L. & RUMJANEK, F.D. The interaction of human LDL with the tegument of adult *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 177: 139-144, 1997.

THOMAS, G. *Química Medicinal: uma introdução*. Editora Guanabara Koogan, 2003.

TRACY, J. W.; CATTO, B. A.; WEBSTER, L. T. Reductive metabolism of niridazole by adult *Schistosoma mansoni*. Correlation with covalent drug binding to parasite macromolecules. *Mol. Pharmacol*. 24: 291-299, 1983.

UTO H.; NAKANISHI C.; IDO A.; HASUIKE S.; KUSUMOTO K.; ABEA H.; NUMATAA M.; NAGATA K.; HAYASHI K.; TSUBOUCHI H. The peroxisome proliferator-activated receptor- agonist, pioglitazone, inhibits fat accumulation and fibrosis in the livers of rats fed a choline-deficient, l-amino acid-defined diet, *Hepatology Research*. 32: 235–242, 2005.

UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; TU, Z.; SHUHUA, X.; TANNER, M. Comparative study of the effects of artemether and artesunate on juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in experimentally infected mice. *Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene*, 96: 318-323, 2002.

VALE, N.; MOREIRA, R.; GOMES, P. *Quimioterapia da malária. Um século no desenvolvimento de antimaláricos*. *Química* 099, 2005.

VALLE, C.; TROIANI, A.R.; FESTUCCI, A.; PICA-MATTOCCIA, L.; LIBERTI, P.; WOLSTENHOLME, A.; FRANCKLOW, K.; DOENHOFF, M.J.; CIOLI, D. Sequence and level of endogenous expression of calcium channel β subunits in *Schistosoma mansoni* displaying different susceptibilities to praziquantel. *Mol. Biochem. Parasitol*, 130: 111–115, 2003.

VENNERVALD, B.J.; BOOTH, M.; BUTTERWORTH, A.E.; KARIUKI, H.C.; KADZO, H.; IRERI, E.; AMAGANGA, C.; KIMANI, G.; KENTY, L.; MWATHA, J.;

- OUMA, J.H.; DUNNE, D.W. Regression of hepatosplenomegaly in Kenyan school-aged children after praziquantel treatment and three years of greatly reduced exposure to *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 99: 150-160, 2005.
- VERMA, A.; SARAF, S.K. 4-Thiazolidinone e A biologically active scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 43: 897-905, 2008.
- VRANJAC, A. *Vigilância Epidemiológica e Controle da Esquistossomose*, 2007.
- WAGENER, M.; LOMMERSE, J. P. M. *J. Chem. Inf. Model.* 2006, 46, 677–685.
- WALSH, D. A. Uwaydah, I. M.; U.S. pat. 5,061,720, 1991.
- WARE, E. The chemistry of hydantoin. *Chem. Rev.*, 46: 403-470, 1950.
- WASILEWSKI, M.M.; LIMB, K.C.; PHILLIPS, J.; MCKERROW, J.H. Cysteine protease inhibitors block schistosome hemoglobin degradation in vitro and decrease worm burden and egg production in vivo. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 81: 179- 189, 1996.
- WATSON, M.B.S.; Praziquantel, *Journal of Exotic Pet Medicine*, 18: 229-231, 2009.
- WEBSTER, L. T.; BUTTERWORTH. A. E.; MAHMOUD. A. A. F.; MGOLA. E. N.; WARREN, K. S. Suppression of delayed hypersensitivity in schistosome-infected patients by niridazole. *N. Engl. J. Med.* 292: 1144-1147, 1975.
- WHO, World Health Organization. The social context of schistosomiasis and its control. *Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases (TDR)*, 2008.
- WHO–World Health Organization.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/index.html>. Consulta: 11/07/2010.
- WROBEL, J.; LI, Z.; D, A.; MCCALEB, M.; MIHAN, B.; SREDY, J. SULLIVAN, D. Novel 5-(3-Aryl-2-propynyl)-5-(arylsulfonyl)thiazolidine-2,4-diones as Antihyperglycemic Agents. *J. Med. Chem.* 41: 1084-1091, 1998.
- XIAO, S.; BINGGUI, S.; CHOLLET, J.; TANNER, M. Tegumental changes in 21-day-old *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with artemether. *Acta Tropica* 75: 341–348, 2000.
- XIAO, S.H.; CATTO, B.A. In vitro and in vivo studies of the effect of Artemether on *Schistosoma mansoni*. *Antimicrob Agents Chemothe*, 33:1557-62, 1989.
- XIMENES, R.A. Social environment, behavior, and schistosomiasis in an urban population in the Northeast of Brazil. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 9(1):13-22, 2001.

YANG, P.; YANG, Q.; QIAN, X.; TONG, L.; LI, X. Isoquino[4,5-bc]acridines: Design, synthesis and evaluation of DNA binding, anti-tumor and DNA photo-damaging ability. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 84: 221–226, 2006.

YUAN, H.C.; GUO, J.G.; BERGQUIST, R.; TANNER, M.; CHEN, X.Y.; WANG, H.Z. The 1992–1999 World Bank schistosomiasis research initiative in China: outcome and perspectives. *Parasitol. Int.* 49: 195–207, 2000.

ZHANG, G. et al. Afrique ou Asie, quelle est l'origine évolutive des schistosomes humains? *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Series III*, 324: 1.001-1.010, 2001.