

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

**NOVAS MOLÉCULAS IMIDAZOLIDÍNICAS: POTENCIAIS
CANDIDATAS A FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS**

Andréa Cristina Apolinário da Silva

Recife – 2008

Andréa Cristina Apolinário da Silva

NOVAS MOLÉCULAS MIDAZOLIDÍNICAS: POTENCIAIS CANDIDATAS A FÁRMACOS ESQUISTOSSOMICIDAS

Tese de doutoramento apresentada ao Doutorado em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, na Área de concentração Farmacologia, Fisiologia e Química Medicinal.

Orientadores:

Profa. Dra. Suely Lins Galdino

Profa. Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

Recife – 2008

Silva, Andréa Cristina Apolinário

Novas moléculas imidazolidínicas: potenciais candidatas a fármacos esquistossomicidas/ Andréa Cristina Apolinário da Silva. – Recife: O Autor, 2011.

121 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Suely Lins Galdino

Co-orientadora: Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas, Farmacologia, Fisiologia e Química Medicinal, 2008.

Inclui bibliografia e anexos

1. Esquistossomose 2. Medicamentos 3. Imidazolidina I. Título.

547.593

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2011-193

Andréa Cristina Apolinário da Silva

TESE DE DOUTORADO APRESENTADA POR ANDRÉA CRISTINA
APOLINÁRIO DA SILVA AO **PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS** COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS
PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

DEFENDIDA PUBLICAMENTE EM 29 DE JULHO DE 2008 DIANTE DA
BANCA EXAMINADORA:



Professora Dra. Suely Lins Galdino
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco



Professora Dra. Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque
Departamento de Medicina Tropical
Universidade Federal de Pernambuco



Professora Dra. Glória Isolina Boente Pinto Duarte
Departamento de Fisiologia e Farmacologia
Universidade Federal de Pernambuco



Professora Dra. Paloma Lys de Medeiros
Departamento de Histologia e Embriologia
Universidade Federal de Pernambuco

SONHO IMPOSSÍVEL

“Sonhar mais um sonho impossível.

Lutar quando é fácil ceder

Vencer o inimigo invencível

Negar quando a regra é vender

Sofrer a tortura implacável

Romper a incabível prisão

Voar num limite provável

Tocar o inacessível chão

É minha lei, é minha questão.

Virar este mundo, cravar este chão.

Não me importa saber, se é terrível demais.

Quantas guerras terei que vencer, por um pouco de paz.

E amanhã este chão que eu deixei

Por meu leito e perdão

Por saber que valeu

Delirar e morrer de paixão

E assim, seja lá como for

Vai ter fim a infinita aflição

E o mundo vai ver uma flor, brotar do impossível chão.”

CHICO BUARQUE DE HOLANDA

Aos meus pais
Antônio Apolinário da Silva e Alda Maria
Peixoto Apolinário,
Aos meus irmãos Luiz Carlos Apolinário
da Silva e Luiz Cristiano Apolinário da
Silva,
Aos meus sobrinhos Luiz Cristiano
Apolinário da Silva Filho e Cauã
Henrique,

Aos meus avós Antônio Peixoto (*in memoriam*) e Maria da Glória Peixoto
Apolinário

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Professora Dra. Suely Lins Galdino, do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE, e à Professora Dra. Mônica Camelo Pessoa Azevedo de Albuquerque, do Departamento de Medicina Tropical da UFPE, pela orientação, incentivo, colaboração e credibilidade na realização deste trabalho;

Ao Professor Dr. Ivan da Rocha Pitta, do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE pela colaboração e pela atenção dispensadas no decorrer do trabalho;

A Professora Dra. Maria do Carmo Alves de Lima, do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE pela valiosa cooperação, amizade e incentivo e acima de tudo credibilidade;

Aos Professores do Departamento de Medicina Tropical, pelo convívio saudável, em especial ao Professor João Inácio e a Márcia Pascoal pela amizade e companheirismo.

A minha amiga e irmã, Manuela dos Santos Carvalho pela amizade, companheirismo, incentivo e momentos agradáveis vividos sempre que nos encontramos;

Aos meus amigos Rejane Dias, Marivania Silva, Rossana Karla, Érika Cavalcante, Anderson José, Deivson Cavalcante, Veronilda Almeida, Maria da Conceição Borba ao Pe. Benevides, pela compreensão devido a minha ausência nesse período.

Aos amigos do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos Cleiton Diniz, Francimary Guedes, Camila Marques, Renata Calado, Rafaela Miranda, Aracely França, Sandra Botelho, Lindalva Marques, Sandra Cristina, Fabiana Oliveira, Juliana Cruz, Maria Juliana Dantas, Maria Andréa Santos, Breno Moacir, Rafael Ferro, Marina Pitta, Laudelina Magalhães, Tiago Bento, Thiago Lins-Lins, Iane Bezerra, Cibele Lacerda, Natália Freitas, Natália Colaço, Pedro Canudo, Anekécia Lauro, Luíza Daniele, Micheline Miranda, Diana Malta, Ricardo Moura, Leila Cabral, Flávia Uchôa, Daniel Tarcisio Martins Pereira por toda colaboração e agradável convívio durante o período de desenvolvimento do trabalho;

Aos amigos do Laboratório de Esquistossomose experimental e de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), Prof. Elizabethy Malagueño, Prof. Silvania, Prof. Valdênia Souza, Maria da Conceição, Iana Rafaela, Narjara Tiane, Patrícia D'Emery, Carolina Sanuzi, Djalma Santos, Werverton Ricardo, Marek Henrique, Andrew, Poliana Guabiraba pela amizade e cooperação;

As minhas companheiras na atividade esquistossomicida Juliana Kelle Neves, Fernanda Cezar, Aline Candido e Milena Sobral pela colaboração, paciência, companheirismo e, sobretudo amizade, sem elas esse trabalho não seria possível;

A Professora Dra. Vláudia Costa pela contribuição da avaliação imunológica deste trabalho, que me ajudou com sua valiosa colaboração;

A Professora Dra. Paloma Lys e a Professora Dra. Eliete Cavalcanti pela colaboração da avaliação histológica, e a Maria de Fátima pelo ensinamento e paciência;

Aos Farmacêuticos do Pronto Socorro Cardiológico de Pernambuco (PROCAPE) pela colaboração, compreensão e solidariedade durante o período de desenvolvimento da tese.

A Adenilda Eugênia Lima, secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, pela sua amizade, disponibilidade e eficiência;

A todos os funcionários do Departamento de Antibióticos e do LIKA;

Ao meu irmão Luiz Carlos Apolinário da Silva, pelo carinho, cuidado e paciência durante toda a vida, principalmente nesse período tão difícil.

A toda a minha família, pelo apoio que sempre me foi dado, em especial minha mãe Alda Maria Peixoto Apolinário e ao meu pai Antonio Apolinário da Silva, pelo cuidado, carinho, amor e confiança depositada em mim.

Um agradecimento especial ao meu avô Antonio Peixoto da Silva (*in memoriam*) pela vida, digna, honesta e batalhadora dedicada à família, pelo exemplo de carinho e amor para conosco, sendo esse o meu maior exemplo de vida.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ESQUEMAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1. INTRODUÇÃO	23
2. OBJETIVOS	27
2.1. Geral	27
2.2. Específicos	27
3. REVISÃO DA LITERATURA	29
3.1. Doenças Tropicais Negligenciadas	29
3.2. Esquistossomose: uma doença negligenciada	30
3.2. Ciclo Evolutivo	31
3.3. Distribuição geográfica e dados epidemiológicos	32
3.4. Esquistossomose no Brasil	34
3.5. Controle da esquistossomose	37
3.6. Patogenia	38
3.7. Imunopatologia na esquistossomose mansônica	40
3.8. Esquistossomose e vacina	43
3.9.1. Fármacos com atividades esquistossomicida: passado, presente e futuro	44
3.9.2. Resistência ao praziquantel	52
3.9.3. Imidazolidinas	54
4. ESTUDO QUÍMICO	57
4.0. SÍNTESE DOS DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS	58

4.1. MATERIAL	58
4.2. METODOLOGIA	58
4.2.1. PROCEDIMENTO	59
4.2.1.1. Derivados 5-benzilideno-3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS)	59
4.2.1.1.1 Características Físico-químicas dos derivados 5-benzilideno-3- benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS)	61
4.2.2. Derivados 5-benzilideno-3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT)	62
4.2.2.1. Características Físico-químicas dos derivados 5-benzilideno-3- benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT)	63
4.2.3. Derivados 5-arilazo-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT)	64
4.2.3.1. Características Físico-químicas dos derivados 5-arilazo-3-benzil-4- tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT)	66
ESTUDO BIOLÓGICO	68
5. Material e Métodos	69
5.1. Material e equipamentos	69
5.2. Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> do <i>Schistosoma mansoni</i> frente a derivados imidazolidínicos	70
5.2.1 Obtenção de miracídios e infecção de moluscos do gênero <i>Biomphalaria</i>	70
5.2.2. Infecção de camundongos com cercárias de <i>S. mansoni</i>	70
5.2.3. Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> do <i>S. mansoni</i>	71

5.3. Avaliação da suscetibilidade <i>in vivo</i> do <i>Schistosoma mansoni</i> frente aos derivados imidazolidínicos	72
5.3.2. Tratamento dos camundongos infectados	72
5.3.3. Preparações para administração oral do derivado imidazolidínico LPSF/PT05	73
5.3.3.1. Preparação	73
5.3.3.1.1. Preparação da Emulsão óleo-água 30 %	73
5.3.3.1.2. Preparação da suspensão base para a dispersão sólida do LPSF/PT05 em PEG	74
5.3.4. Oograma	74
5.3.5. Número de vermes recuperados nas veias intra-hepática e mesentéricas	75
5.3.6. Avaliação do efeito do derivado LPSF/PT05 na regulação da resposta imune celular de camundongos infectados com <i>Schistosoma mansoni</i>	75
5.3.6.1. Culturas de células esplênicas	75
5.3.6.2. Dosagem de citocinas	76
5.3.6.3. Dosagem de óxido nítrico (NO) pelo método de Griess	77
5.3.7. Análise histopatológica	77
6. Resultados e discussão	79
6.1. Avaliação <i>in vitro</i> dos derivados imidazolidínicos frente aos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> (Cepa BH)	80
6.2. Avaliação <i>in vivo</i> dos derivados imidazolidínicos frente aos vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> (Cepa BH) suspensos em Tween 80	82
6.2.1. Redução no número de vermes recuperados	82
6.2.2. Resultados do oograma e do Kato-Katz	84
6.3. Efeito do tratamento do derivado LPFSF/PT05 na produção de citocinas e óxido nítrico	86
6.4. Avaliação histopatológica do derivado imidazolidínico	

LPSF/PT05	92
7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	100
7.0. CONCLUSÕES	101
7.1 PERSPECTIVA	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	104
9. ANEXOS	

Resumo

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica das regiões tropicais e subtropicais e está associada a uma alta morbidade da população infectada. A terapia da esquistossomose é feita apenas com um único fármaco, o praziquantel, ativo contra todas as espécies de *Schistosoma*, e o oxamniquina ativo apenas contra o *Schistosoma mansoni*. Contudo há relatos na literatura de resistência do parasito ao tratamento para os dois fármacos, gerando uma preocupação a nível mundial e levando a Organização Mundial de Saúde (OMS) convocar a indústria e os pesquisadores a buscar novos fármacos com esta finalidade. Neste contexto a busca de novos fármacos com atividade esquistossomicida torna-se o objetivo deste trabalho, onde os derivados imidazolidínicos das séries 5-benzilideno-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT), 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS) e 5-arilazo-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT) foram avaliados *in vitro* frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Cepa BH). Dos derivados avaliados *in vitro* os que apresentaram atividade esquistossomicida, foram os derivados da série 3-benzil-5-(arilazo)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT). Para a avaliação *in vivo*, o derivado 3-benzil-5-(4-cloro-arilazo)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT05) foi administrado oralmente em Tween 80, Tween/óleo/água e em dispersão sólida com 90 % PEG (Polietilenoglicol). Apenas esta última apresentou efeito esquistossomicida. Foram administradas quatro doses: 3, 10, 30 e 100 mg/kg. A redução do número de vermes recuperados foi significativa para a dose de 10 e 30 mg/kg, aproximadamente 50 % e para a dose de 100 mg/kg a redução foi de 68%. A redução do número de vermes na dose de 100 mg/kg corroborou com a resposta imune celular do derivado e levantou a hipótese do seu efeito imunossupressor ser ao nível de resposta Th1 e Th2. Somado a esses dados a resposta histopatológica revelou uma modulação na resposta granulomatosa, produziu uma ação contra o dano hepático causado pela infecção pelo *S. mansoni*.

Palavras Chaves: Esquistossomose, Atividade Esquistossomicida, Imidazolidina, Avaliação *in vivo*.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a chronic parasitic disease in tropical and subtropical regions and is associated with morbidity high of the infected population. The treatment of schistosomiasis is made only with a single drug, praziquantel, active against all species of *Schistosoma* and oxamniquine active only against *Schistosoma mansoni*. However there are reports in the literature of parasite resistance to treatment for the two drugs, causing a worldwide concern and leading to the World Health Organization (WHO) to call industries and researchers to seek new drugs for this purpose. In this context the search for new drugs with schistosomicide activity becomes the objective of this work, where the derivatives serie imidazolidinics of 5-benzilidene-3-benzyl-4-tioxo-imidazolidin-2-one (LPSF/PT), 5-benzilidene -3-(4-methyl-benzyl)-imidazolidin-2,4-dione (LPSF/MS) and 5-arylazo-4-tioxo-imidazolidin-2-one (LPSF/PT) were evaluated *in vitro* against adult worms of *Schistosoma mansoni* (Cepa BH). The derivatives evaluated *in vitro* showed that the schistosomicide activity, were derived from the series 3-benzyl-5-(arylazo)-4-tioxo-imidazolidin-2-one (LPSF/PT). For the evaluation *in vivo*, the derivative 3-benzyl-5-(4-chloro-arylazo)-4-tioxo-imidazolidin-2-one (LPSF/PT05) was administered orally in Tween 80, Tween/oil/water and sound dispersion with 90% PEG (Polyethylene). Only the latter presented schistosomicide effect. They were given four doses: 3, 10, 30 and 100 mg / kg. The reduction in the number of worms recovered was significant for a dose of 10 and 30 mg / kg, approximately 50% and for a dose of 100 mg / kg reduction was 68%. The reduction in the number of worms in the dose of 100 mg/kg corroborated with the cellular immune response of the derivative and raised the possibility the effect of immunosuppressive be at the level of Th1 and Th2 response. In addition to these data to answer histology revealed a modulation in response granulomatous, produced an action against liver damage caused by infection with *S. mansoni*.

Keywords: Schistosomiasis, antischistosomal activity, imidazolidine, Evaluation *in vivo*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD – Cromatografia em Camada Delgada
Cepa BH – Cepa de *S. mansonii* oriunda de Belo Horizonte – MG
DALY - Disability Adjusted Life Years
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNDi - Drugs for Neglected Diseases Initiative
HEPES – Sal sódico do ácido *N*-(2-hidroxietil)-piperazina *N'*-(2-etanosulfônico)
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IL- Interleucina
IFN γ - Interferon gama
IV – Infravermelho
LIKA – Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LPSF – Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos
Mm – Milimolar
 μ g/mL – Micrograma/ Mililitros
NO- Óxido nítrico
OMS – Organização Mundial de Saúde
PEG – Polietilenoglicol
RMN¹ H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPMI – Roswell Park Memorial Institute
SIM - Sistema de Informação sobre Mortalidade
TDR – Tropical Diseases Research
Teg - Tegumento
TWEEN 80 - Sorbitan mono-9-octadecenoate poli (oxi-1,2-ethanedil)
UI/mL – Unidade Internacional/Mililitros
WHO - World Health Organization

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01: Moléculas imidazolidínicos LPSF/MS0 e LPSF/PT	59
Esquema 02: Diagrama de síntese dos derivados da série 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS)	60
Esquema 03: Diagrama de síntese dos derivados da série 5-benzilideno-3-benzil-4-tioxi-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT)	62
Esquema 04: Diagrama de síntese dos derivados LPSF/PT	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Ciclo biológico do <i>S. mansoni</i>	32
Figura 02 - <i>Representação da distribuição mundial da esquistossomose</i>	34
Figura 03 - Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica. Brasil, 2004.	35
Figura 04 - Prevalência de infecção por <i>Schistosoma mansoni</i> na Zona da Mata do Estado de Pernambuco, Nordeste Brasil. A linha tracejada indica o limite mais baixo (10%) para a moderada prevalência da esquistossomíase	37
Figura 05 – Tartarato de antimônio e potássio	45
Figura 06 – Emetina	45
Figura 07 - a: Lucantona b:Hicantona	46
Figura 08 - Metrifonato	46
Figura 09 - Niridazol	47
Figura 10 - Oxamniquina	47
Figura 11 - Tubericina	48
Figura 12 -Praziquantel	48
Figura 13 - Amoscanato	50
Figura 14 - Oltipraz	50
Figura 15 - Ciclosporina A	50
Figura 16 - Estrutura da imidazolidina-2,4-diona	54
Figura 17 – Derivados 1-(arilideno-amino)-3-ciclo-hexil-2-tioxo-imidazolidina-4,5-dionas	55
Figura 18 – (a) 5,5-Difenil-hidantoína e (b) 5-(<i>p</i> -clorofenil)-5-metil-hidantoína	55
Figura 19 – (a) 5-(2,4,5-tricloro-fenil)-hidantoína e (b) 1-(5-nitro-tiofeno-3-il)-2-tioxo-imidazolidina	56

Figura 20 - Estruturas químicas do niridazol e da imidazolidina-2,4-diona	79
Figura 21 - Estruturas químicas dos derivados 5-arilazo-imidazolidínicos quando comparados aos 5-benzilideno-imidazolidínicos	80
Figura 22 - Redução no número de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> testados com LPSF/PT-05 em dispersão sólida de LPSF/PT05 em PEG	83
Figura 23 - Estádios de ovos de <i>S. mansoni</i> em fragmentos intestinais de camundongos infectados	85
Figura 24 - Redução no número de ovos por grama de fezes (Método Kato-Katz)	85
Figura 25 - Produção de IL-10 em sobrenadantes das culturas de células em CO ₂ a 37 °C dos grupos de camundongos tratados com praziquantel, em dosagens de 25, 50 e 100 mg/Kg, e no grupo controle;	86
Figura 26 - Produção de IL-4 em sobrenadantes das culturas de células em CO ₂ a 37 °C dos grupos de camundongos tratados com praziquantel, em dosagens de 25, 50 e 100 mg/Kg, e no grupo controle;	87
Figura 27 - Produção de IFN-γ em sobrenadantes das culturas de células esplênicas de camundongos tratados com praziquantel, em dosagens de 25, 50 e 100 mg/Kg, e no grupo controle;	87
Figura 28 - Produção de óxido nítrico em sobrenadantes das culturas de células em CO ₂ a 37 °C dos grupos de camundongos tratados com praziquantel, em dosagens de 25, 50 e 100 mg/Kg, e no grupo controle;	88
Figura 29 - a: Dosagem de IL-4 em sobrenadantes das culturas de células esplênicas de camundongos tratados com LPSF/PT5, nas dosagens de 3, 10 e 100 mg/Kg, e no grupo controle não tratado. As células foram cultivadas com ou sem estímulos de SEA, SWAP e ConA; b: Dosagem de IFN-γ em sobrenadantes das culturas de células esplênicas de camundongos tratados com LPSF/PT5, nas dosagens de 3, 10 e 100 mg/Kg, e no grupo controle não tratado. As células foram cultivadas com ou sem estímulos de SEA, SWAP e ConA;	89
Figura 30 - IFN-γ(a) IL4 e (b) produzidos por camundongos infectados com <i>S. mansoni</i> tratados ou não tratados com LPSF-PT05. As células de baço foram obtidos a partir de 60 dias camundongos infectados (tratado ou não) e cultivadas a 72h antes da colheita dos sobrenadantes a determinação de citocinas por ELISA e de produção nitrito. (c) produção de óxido nítrico detectadas por nitrito determinar a acumulação método Griess. Médias Aritméticas + SD experimentos em duplicata: * inferior ao controle p <0,05.	90

Figura 31 - Fotomicrografias de estágio de granulomas no fígado (A, C, E e G) e no intestino (B, D, F e H) de camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com o LPSF/PT05 em preparação com salina e tween 80. a e b) controle infectado, observa-se granulomas na fase exudativo-produto tanto no fígado (a) como no intestino (b), c e d) grupo tratado com dose de 25 mg/kg, e e f) grupo tratado com dose de 50 mg/kg e g e H) grupo tratado com dose de 100 mg/kg. Observa-se que existe granulomas na fase exudativo-produto exceto para a dose de 100 mg/kg. H & E. As fotomicrografias estão em ampliação de 100 X. **93**

Figura 32 - Fotomicrografias de estágios de granulomas em fígados e intestinos (respectivamente) de camundongos infectados por *S. mansoni*. a e b) controle infectado, exibindo granuloma em fase exudativa-produtiva (setas). C e d) fígado e intestino, respectivamente, de camundongos infectados e tratados com o LPSF/PT05 em emulsão tween/óleo/água na dose de 3 mg/kg por dia. Apresentando granulomas na fase exudativa-produtiva tanto para o fígado como para o intestino. E e f) (10 mg/kg por dia) no fígado (e) observa-se granulomas em fase de resolução e na fase exudativa-produtiva (f) granuloma em fase de resolução na mucosa intestinal. G e h) (100 mg/kg por dia) observa-se poucos granulomas em fase de resolução (g) e ausência de granulomas no intestino. H & E. as fotomicrografias estão em ampliação de 100 X. **95**

Figura 33 - Fotomicrografias de estágios de granulomas em fígados e intestinos (respectivamente) de camundongos infectados por *S. mansoni*. a e b) controle infectado, exibindo- fase granuloma exsudativos produtiva (setas) com uma maturidade, ovos viáveis no centro da granulomas fibrocelular (fígado) e presença de ovos viáveis (setas) detectou em camadas serosas e submucosa (intestino). c, d) LPSF/PT05 (3 mg / kg por dia), mostrando bem pequenos granulomas fibrocelular circunscritos e com ovos em degeneração (asterisco) no fígado e granulomas nas fase produtivo e em resolução (asterisco) em camadas submucosa (intestino). E e F) LPSF/PT05 (10 mg / kg por dia), produtiva (seta) e resolução (asterisco) foram encontrados granulomas no fígado e ovos viáveis (seta) foram detectados na submucosa. g e h) LPSF/PT05 (30 mg / kg por dia), granulomas em fase de resolução (asterisco) foram encontradas no fígado e ovos viáveis (setas) foram detectados em camadas submucosa e muscular. i e j) LPFS/PT05 (100 mg / kg por dia) granulomas em fase de resolução (asterisco) foram encontradas no fígado e ovos viáveis (setas), foram detectadas apenas em camadas submucosa. H & E e Masson 'Tricomico, as fotomicrografias estão em ampliação de 100x. **98**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Informações gerais sobre a incidência da esquistossomose mansônica nos Estados da Bahia, Sergipe, Alagoas e Pernambuco, no período de 1999-2003 **36**

Tabela 02 - Intensidade de infecção de acordo com a carga parasitária **72**

Tabela 03 - Estrutura química geral dos derivados imidazolidínicos **81**

Tabela 04 – Média do número de granulomas hepáticos de animais infectados e tratados com LPSF/PT05-PEG **97**

Tabela 05 - Média do número de granulomas hepáticos de animais infectados e tratados com LPSF/PT05-PEG **97**



INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas são um grupo de doenças infecciosas, prevalentes em países pobres e ricos, porém esse último com menor proporção. São responsáveis por alta carga de morbidade e mortalidade, que geram impactos sociais e econômicos negativos e afetam profundamente a qualidade de vida da população. Embora existam alguns incentivos de mercado para a pesquisa e desenvolvimento nos países desenvolvidos para essas doenças, o nível de investimento não é proporcional à sua carga global. A Organização Mundial de Saúde (OMS) criou um Programa Especial de Pesquisa e Treinamento em Doenças Tropicais Negligenciadas (TDR) no qual classificou as doenças negligenciadas em três categorias. Na categoria I são emergentes ou fora de controle, como exemplo temos: doença do sono, dengue e leishmaniose. Na categoria II estão aquelas que apesar de existir uma estratégia de controle, sua carga persiste. Como exemplos têm a malária, esquistossomose e tuberculose. E, finalmente, na categoria III encontra-se com estratégias de controle eficazes, sua carga vem diminuindo e espera-se sua eliminação como problema de Saúde Pública. Estas doenças são hanseníase, filariose, tripanossomíase e oncocercose (BRASIL, 2006).

Dentre as doenças negligenciadas a esquistossomose é uma das mais importantes nos países tropicais, apresentando altas taxas de prevalência e o índice de mortalidade estimado é de 14000 por ano (GRYSEELS, 2006), ocupando os primeiros lugares dos maiores problemas de Saúde Pública nos países em desenvolvimento perdendo apenas para a malária (KING et al., 2005).

No Brasil, apresenta um quadro de continuidade e expansão da esquistossomose, que não se diferencia dos demais países acometidos por essa parasitose (BARBOSA et al., 1996). Estima-se que cerca de 7 milhões de pessoas estejam infectados e que aproximadamente 35 milhões vivem em área de risco (CHITSULO et al., 2000). Esse fato não pode ser explicado apenas por

um fenômeno biológico, mas também por fatores sociais, políticos e culturais envolvidos que permitem a manutenção da doença como: Falta de saneamento básico, precárias condições de habitação e saúde e uma ineficiente educação sanitária (BARBOSA et al., 1996). A esquistossomose abrange uma grande área endêmica, que vai do Maranhão até o Estado de Minas Gerais. Contudo há focos isolados no Distrito Federal e nos Estados do Pará, Piauí, Goiás, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (COURA E AMARAL, 2004).

Em Pernambuco, a esquistossomose continua endêmica independente das campanhas de controle realizadas pelo Ministério da Saúde, principalmente na região da Zona da Mata (FAVRE et al., 2001). Segundo a última avaliação realizada pela Fundação Nacional de Saúde (FUNASA) entre os anos de 1996 e 1999, revelou um índice de prevalência acima de 10 % em 35 municípios (FAVRE et al., 2006).

Contudo, dados obtidos do Sistema de Informação sobre Mortalidade (SIM), e de base de dados demográficos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), revelam que houve uma redução de 62 % no coeficiente de mortalidade por esquistossomose no Brasil onde tínhamos uma taxa de 0,70/100.000 habitantes em 1980, reduzindo-se para 0,26/100.000 em 2003. Essa redução não se deu de forma crescente ao longo dos anos. Porém, o início da redução foi marcado a partir de 1986 quando a estratégia de controle da doença no Brasil foi mudada, onde tivemos a maior utilização da quimioterapia (FERREIRA et al., 2007). Contudo, apesar de todo o esforço para a adesão nos programas de controle durante estes últimos 25 anos, há regiões que ainda apresentam prevalência da esquistossomose mansônica acima de 50 % (PASSOS e AMARAL, 1998; FARIAS et al., 2007).

Atualmente, a quimioterapia ainda é a estratégia de controle utilizada para a esquistossomose e resume-se apenas em um único fármaco recomendado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) o praziquantel o qual é ativo contra as três principais espécies de *Schistosoma*: *S. mansoni*, *S. haematobium* e o *S. japonicum* (HARDER, 2002; WHO, 2003; DOENHOFF e

PICA-MATTOCCIA, 2006). Embora não sejam os fármacos de primeira escolha para o tratamento da esquistossomose segundo OMS, a oxaminiquina ainda é usada em países como o Brasil sendo este fármaco ativo apenas contra o *S. mansoni* e o metrifonato ativo contra o *S. haematobium* não apresentando eficácia contra as demais espécies (HARDMAN et al., 2003; CIOLI, 1995).

Contudo, fatores como: a grande extensão de áreas endêmicas, constantes reinfecção dos indivíduos e as más condições sanitárias dos países tropicais como o Brasil conduzem a ineficiência do tratamento quimioterápico (BERGQUIST, 1998). Outra importante limitação do fármaco praziquantel está na sua baixa eficácia no tratamento da esquistossomose aguda ou toxêmica, devido a sua baixa atividade contra os vermes imaturos de *Schistosoma*. Somada a toda esta problemática o desenvolvimento de resistência aos fármacos esquistossomicidas vem sendo relatada na literatura, resistência esta tanto a nível experimental como a nível das populações (CIOLI et al., 1993; FALLON e DOENHOFF, 1994; COELHO et al., 1997; SABADINI e DIAS, 2002; MELO et al., 2003, ISMAIL et al., 1999; LIANG et al., 2001, KATZ et al., 1973, BOTROS et al., 2005; STELMA et al., 1995). Neste contexto, é imperiosa a necessidade de estudos relacionados ao desenvolvimento de novos fármacos com atividade esquistossomicida.

Visando a busca de novos agentes com tal finalidade, o presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas: a avaliação dos derivados imidazolidínicos *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni* e deste o que apresentou a melhor atividade na mortalidade dos vermes foi realizada uma avaliação *in vivo* na qual, parâmetros como o efeito na regulação da resposta imune celular e os aspectos histopatológico do fígado e do intestino retirados dos camundongos infectados e tratados com o derivado.



OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Este trabalho teve como proposta contribuir para a busca de novos fármacos esquistossomicidas. Assim, a avaliação da susceptibilidade *in vitro* e *in vivo* do *Schistosoma mansoni* frente aos derivados das séries 5-benzilideno-imidazolidínicos (LPSF/MS e LPSF/PT) e 5-arilazo-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT).

2.2 Específicos

Avaliar a atividade esquistossomicida *in vitro* dos derivados 5-benzilideno-imidazolidínicos (LPSF/MS e LPSF/PT) e 5-arilazo-4-tioxo-imidazolidín-2-ona (LPSF/PT) frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Cepa BH);

Avaliar a atividade esquistossomicida *in vivo* do derivado LPSF/PT05 frente a vermes adultos de *S. mansoni* (Cepa BH);

Avaliar o efeito do derivado LPSF/PT05 na regulação da resposta imune celular de camundongos infectados com *S. mansoni* (Cepa BH).

Analisar os aspectos histopatológicos do fígado e intestino retirados de camundongos infectados e tratados com o derivado LPSF/PT05.



REVISÃO DA LITERATURA

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Doenças Tropicais Negligenciadas

O termo “doenças negligenciadas se refere a doenças que afetam populações carentes, dos países pobres” (KINDHAUSER, 2003). Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO/OMS), doenças negligenciadas afetam quase que exclusivamente as pessoas pobres que vivem em zonas rurais de países de baixa renda (HUNT et al., 2007).

As doenças tropicais negligenciadas são, em grande parte, compostas por doenças tropicais infecciosas. Dentre elas, existe um grupo de 13 doenças que afetam mais de um bilhão de pessoas no mundo. Sete das 13 doenças tropicais negligenciadas são causadas por helmintos (*Wuchereria bancrofti*, *Schistosoma sp*, *Ancylostoma duodenale*, *Necator americanus*, *Dracunculus medinensis*, *Onchocerca volvulus*, *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura*), três são causadas por protozoários (*Trypanosoma gambiense*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania sp*) e as outras três são causadas por bactérias (*Mycobacterium leprae*, *Chlamydia trachomatis* e *Mycobacterium ulcerans*) (HOLVECK et al., 2007; WHO, 2007; BILL e MELLINDA FOUNDATION, 2007). Os principais fatores responsáveis pela alta prevalência seriam: a água não tratada, deficiência no saneamento básico e precárias condições de habitação.

Segundo a Rede Global de Controle para Doenças Tropicais Negligenciadas (Global Network for Neglected Tropical Diseases Control - GNNTDC) estas causam um impacto em 2,7 bilhões de pessoas em 142 países da África, América Central, América do Sul, Ásia e Oceania (GNNTDC, 2007).

Ao nível global, 75 % das pessoas acometidas são crianças e jovens com menos de 14 anos. Além do sofrimento físico e psicológico, estas doenças levam a um enorme déficit econômico, pois as populações afetadas apresentam uma baixa produtividade e adicionado a isso o custo elevado do tratamento em longo prazo, que contribui para que se aumente o ciclo de pobreza e de doenças (HUNT, 2007).

Não obstante, a maioria dos fármacos disponíveis no mercado para essas doenças foram descobertos há décadas e frequentemente são limitados

na eficácia, apresentam sérios efeitos colaterais, tudo isso somado ao estado nutricional do paciente ou a ineficácia pela resistência aos fármacos. A pesquisa e o desenvolvimento são necessários na busca de novos fármacos que combatam essas doenças. As recomendações propostas aumentam (incluindo um boletim da Organização Mundial de Saúde (OMS)) e debates onde visam uma forma de estimular a pesquisa e o desenvolvimento na busca de vacinas e novos fármacos para profilaxia e tratamento, haja vista que se encontra um vazio nessa área (MRAZEK, 2003).

Muitos especialistas em doenças tropicais negligenciadas temem que a comunidade internacional não dê a devida importância a essas doenças. Enquanto o recurso global na luta contra AIDS, tuberculose e malária e a Aliança Global para Vacinação e Imunização (GAVI) têm obtido sucesso em gerar recurso para financiar suas causas específicas. Os esforços para tratamento e prevenção de outras doenças tropicais como a filariose linfática, leishmaniose, esquistossomose, doenças de Chagas e helmintos intestinais têm obtido pouco sucesso em atrair a atenção e os recursos internacionais (HOTEZ et al., 2006).

Uma nova geração de fármacos antiparasitários não surgiu até agora devido, principalmente, ao fator econômico. O maior impacto dessas doenças está nas regiões mais pobres do mundo. Essas populações não são vistas como um alvo sustentável para o mercado das indústrias farmacêuticas (RENSLO et al., 2006).

3.2 Esquistossomose: uma doença negligenciada

A esquistossomose é uma doença parasitária causada pelo trematódeo do gênero *Schistosoma*, tendo como principais agentes etiológicos o *Schistosoma mansoni*, encontrado na África, América do Sul e Antilhas, o *Schistosoma haematobium* também encontrado na África e na bacia do Mediterrâneo e o *Schistosoma japonicum* visto no extremo oriente e pacífico ocidental (REY, 2001). Existe uma outra espécie o *Schistosoma intercalatum*, agente de uma modalidade de esquistossomose prevalente em certas áreas da África central e ocidental. Uma quinta espécie, *Schistosoma mekongi*, foi

descrita por Vogue, Bruckner e Bruce (1978) como um parasito que prevalece no Camboja (PESSOA, 1988).

O *Schistosoma mansoni* é o trematódea responsável pela doença parasitária intravenosa mais significativa entre os helmintos, localizados no mesentério na fase adulta, onde a fêmea realiza a postura de ovos diariamente durante anos (WEBBE, 1981). Segundo REY (2001) estima-se que o *S. mansoni* possa viver de três a seis anos. Porém, casos de grande longevidade são descritos em pacientes que continuam a eliminar ovos até 30 anos depois de se mudarem da área endêmica.

3.2 Ciclo Evolutivo

O *S. mansoni* é um parasita heteroxênico, isto é, depende de dois hospedeiros para que se dê sua completa evolução, um intermediário, o molusco do gênero *Biomphalaria* e outro definitivo, o homem.

Os miracídios encontrados no interior dos ovos presentes nas fezes dos hospedeiros definitivos, ao alcançarem a água, são estimulados pelo calor e a alta luminosidade solar, rompem os ovos, e nadam ativamente, até alcançar o hospedeiro intermediário, o próprio miracídio agita-se em movimentos contráteis e rotatórios, e assim, penetra no tecido mole dos moluscos. Dois dias após, o miracídio se transforma em esporocisto I que cresce em tamanho e em 14 dias de infecção, ocorre a formação dos esporocistos II, e este por sua vez, inicia a formação em cercárias (NEVES, 2005).

Um único miracídio pode formar de 100 a 300 mil cercárias, de um único sexo previamente definido. A passagem das cercárias para o meio exterior é influenciada pelos mesmos que estimulam os miracídios, a alta luminosidade e o calor. Uma vez liberadas, as cercárias têm uma sobrevivência de 36 a 48 horas, mas só apresentam a capacidade infectiva nas primeiras 8 horas. Elas penetram ativamente pela pele e mucosas intactas, devido à ação de enzimas líticas e ação mecânica. Após a penetração, denominam-se de esquistossômulos, migram para o tecido subcutâneo, e, penetrando em um vaso, são levados passivamente da pele aos pulmões. Dos pulmões, dirigem-se ao sistema porta-hepático, onde se tornarão vermes adultos, machos e fêmeas, dentro de 30 dias aproximadamente. Ao se tornarem adultos, eles se

acasalam e migram para as veias mesentéricas inferiores, onde ocorre a oviposição na submucosa. Cada fêmea põe cerca de 400 ovos por dia, e apenas 50 % destes alcançam a luz intestinal. Os ovos levam cerca de uma semana para se tornarem maduros. Depois de 20 dias, se os ovos não tiverem alcançado a luz intestinal, ocorre a morte dos miracídios, e esses ovos seguem dois caminhos: ou ficam presos na mucosa intestinal, ou são arrastados ao fígado (figura 01) (NEVES, 2005).

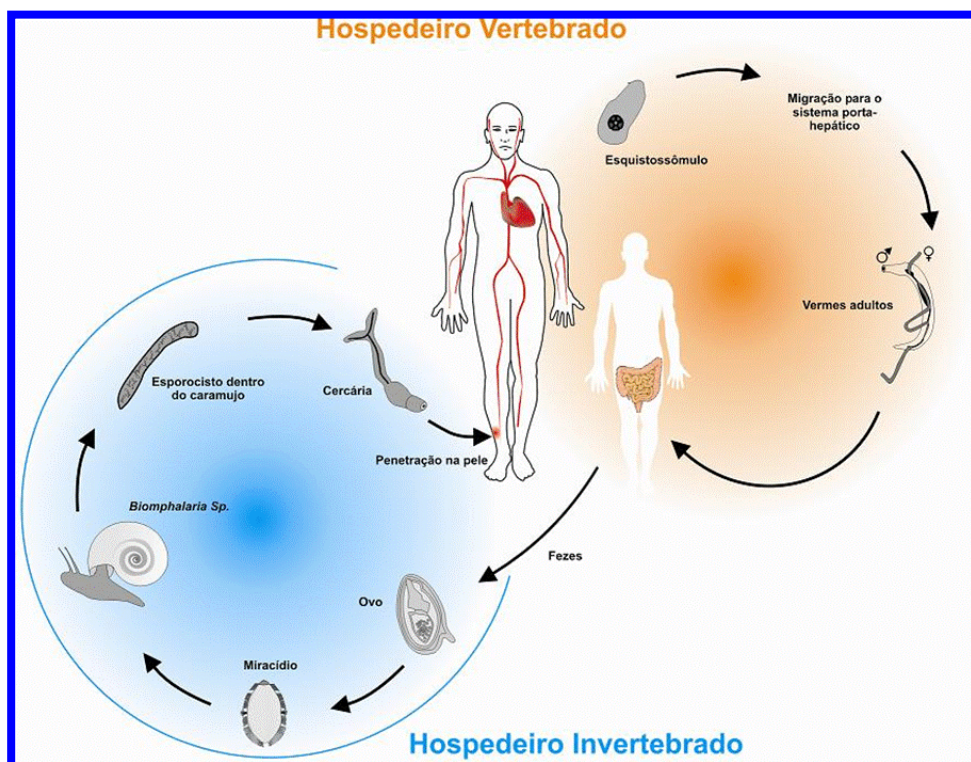


Figura 01: Ciclo biológico do *S. mansoni*.

(<http://www.rgmq.cpqrr.fiocruz.br/modules/edito/edito.php?idedito=26>)

3.3 Distribuição geográfica e dados epidemiológicos

A esquistossomose, depois da malária, é a segunda principal doença parasitária do mundo e afeta a classe mais pobre da sociedade. Sua prevalência é devido à falta de água potável e de uma rede de esgoto apropriada (BLANCHARD, 2004). É uma das mais relevantes doenças parasitárias presentes em países em desenvolvimento. Embora venham ocorridos avanços no tratamento e prevenção da doença, esta ainda continua

atingindo posições significativas na prevalência e na morbidade. É a helmintíase humana mais importante em termos de morbidade e de mortalidade. King e colaboradores, em 2005, referem-se à esquistossomose como Pandemia, e a responsabiliza por 2-15% do subdesenvolvimento da população portadora da doença.

Ocorre em 74 países da América Latina, África e Ásia. Estima-se que 207 milhões de pessoas são infectados, e mais de 779 milhões vivem expostos nas áreas de risco, sendo responsável por 500.000 mortes por ano (FENWICK 2006; KING et al., 2005; VAN DER WERF et al., 2003; BLANCHARD 2004; STEINMANN et al., 2006; PARISE FILHO et al., 2007). Das 207 milhões de pessoas com a doença, 85 % vivem na África, onde a grande maioria das fatalidades ocorre devido ao *S. haematobium*, porém o *S. mansoni* causa 130.000 mortes por ano, pela hipertensão portal (WHO, 2007). Mundialmente, o *Schistosoma mansoni* é o de maior prevalência, apresentando-se endêmico em 55 países, principalmente no sul do Saara africano como também em grande parte da América do Sul (Figura 02) (CHITSULO, 2000).

O DALY (Disability-Adjusted Life Years) é um índice calculado a partir da prevalência específica da doença, mortalidade e o impacto da deficiência gerada pela doença (GRYSEELS et al., 2006). O número global de DALY perdido para a esquistossomose é de 1,7 a 4,5 milhões (UTZINGER et al., 2004, HOTEZ et al., 2006, BROOKER, UTZINGER, 2007).

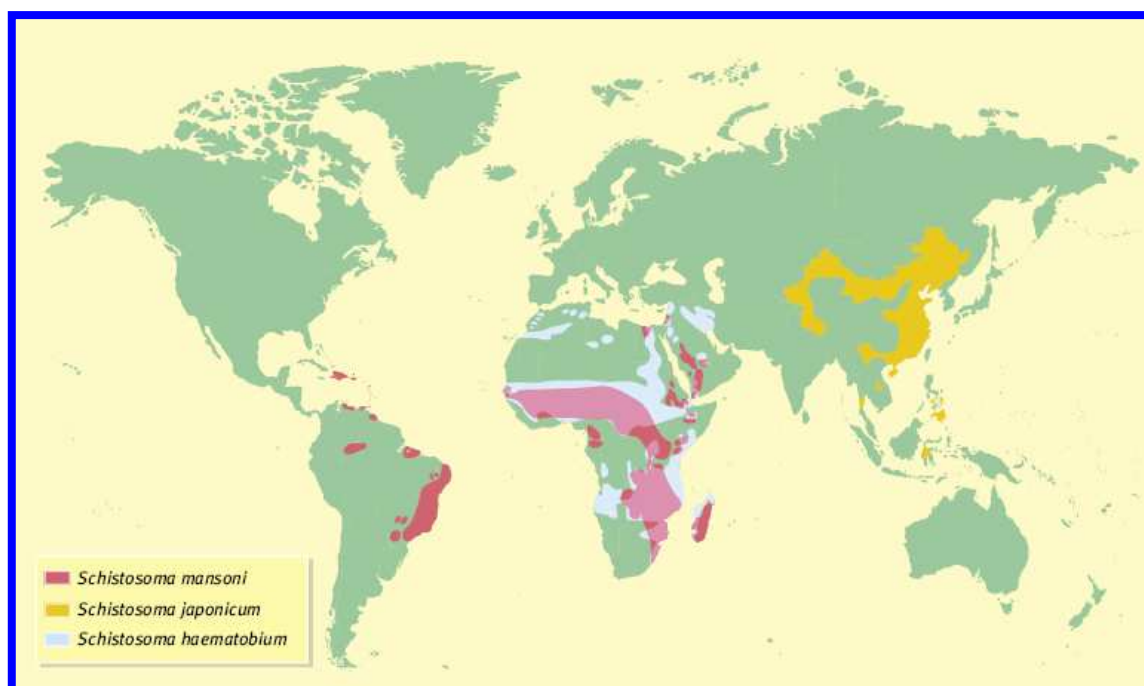


Figura 02: Representação da distribuição mundial da esquistossomose (CONLON, 2005).

A maioria das infecções ocorre na infância, a partir dos quatro anos de idade, com um pico na faixa etária entre 15-20 anos. A idade de maior prevalência coincide com a idade de maior intensidade de infecção (máxima excreção de ovos). Após os 20 anos, a excreção de ovos começa a diminuir, possivelmente como resultado do aumento da imunidade, ou talvez por causa de mudanças comportamentais como, por exemplo, uma menor exposição às águas infectadas. Apenas cerca de 5-15% da população que vive em área de risco torna-se altamente infectada; os fatores limitantes são desconhecidos (KARANJA et al., 2002).

3.4 Esquistossomose no Brasil

O *Schistosoma mansoni* veio para o Brasil durante o século XVI e XVII no período da colonização, com o tráfico negreiro (TCHUENTE et al., 1995). É um parasito de origem africana com maior foco no delta do Nilo e na faixa intertropical ao sul do Saara. Nas Américas, condições ambientais favoráveis para transmissão, como temperatura e luminosidade, bem como o hospedeiro intermediário, o *Biomphalaria*, com ampla distribuição geográfica, facilitando a instalação e a propagação do parasito (REY, 2002).

Devido aos mais diversos fatores que estão envolvidos na transmissão da esquistossomose, há uma dificuldade no controle pelo sistema de saúde. As ações de combate à esquistossomose já estão sendo implantadas no Brasil desde 1976 (FARIAS et al., 2007). Atualmente, no Brasil, a esquistossomose atinge 17 Estados. Estima-se que cerca de cinco a seis milhões de pessoas estão infectadas (REY, 2002). As áreas endêmicas importantes localizam-se em uma faixa que incluem as regiões da Zona da Mata e Litoral abrangendo parte da região do agreste, partindo do Rio Grande do Norte até Minas Gerais (Figura 03).

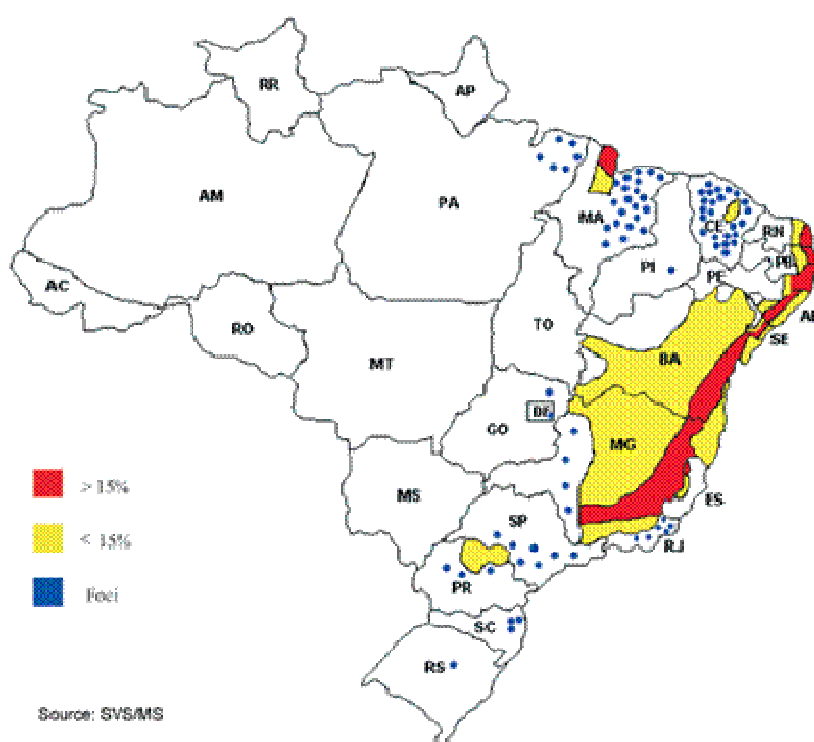


Fig. 1: distribution of schistosomiasis in Brazil.

Figura 03. Áreas endêmicas e focais da esquistossomose mansônica. Brasil, 2004.

Fonte: GT-Equistossomose/CDTV/CGDT/SVS/MS in Brasil, 2005.

Segundo Farias e colaboradores em 2007, os Estados do nordeste do País que apresentam maior incidência da doença são Bahia, Sergipe, Alagoas e Pernambuco, segundo descrito na Tabela 01.

Tabela 01: Informações gerais sobre a incidência da esquistossomose mansônica nos Estados da Bahia, Sergipe, Alagoas e Pernambuco, no período de 1999-2003.

Estado	Total de municípios	Municípios endêmicos	% dos municípios endêmicos
Bahia	417	280	67,15
Sergipe	75	51	68,00
Alagoas	102	70	68,63
Pernambuco	185	72	38,92

Fonte: FARIAS, 2007.

Pernambuco, segundo a Tabela 01, apresenta a doença endêmica em 72 dos 185 municípios, onde a difusão tem sido determinada através da migração da população infectada da área rural, principalmente canaveira, para área urbana, pela ocupação desordenada das áreas ribeirinhas e pela carência de saneamento, acarretando em sucessivos relatos de casos agudos de esquistossomose em Pernambuco (FARIAS et al., 2007; BARBOSA et al., 2001).

Segundo o censo demográfico de 2000, 4.938.861 pessoas residiam na área endêmica, permitindo estimar que cerca de 62% da população de Pernambuco (7.911.937 pessoas) estariam sob risco de infecção.

Em 2006, Favre e colaboradores publicaram um estudo sobre a prevalência da esquistossomose em Pernambuco entre os anos 2000 a 2004, nos municípios da Zona da Mata Norte, Central e Sul. A OMS (2002) classifica a prevalência para *S. mansoni* de acordo com as seguintes percentagens de pessoas positivas: <10% é considerada baixa, entre 10-50% moderada e > 50% a prevalência é considerada alta. Dos 43 municípios avaliados, 12 merecem destaque. Três na micro-região norte: Aliança, Tracunhaém e Lagoa do Carro. Três na micro-região central: Chã de Alegria, Chã Grande e Glória do Goitá. Na micro-região sul seis municípios: Belém de Maria, Catende, Escada, Gameleira, Ribeirão e São Benedito do Sul. Dos 12 municípios em destaque, sete apresentam uma baixa prevalência e cinco municípios, prevalência moderada (Figura 04).

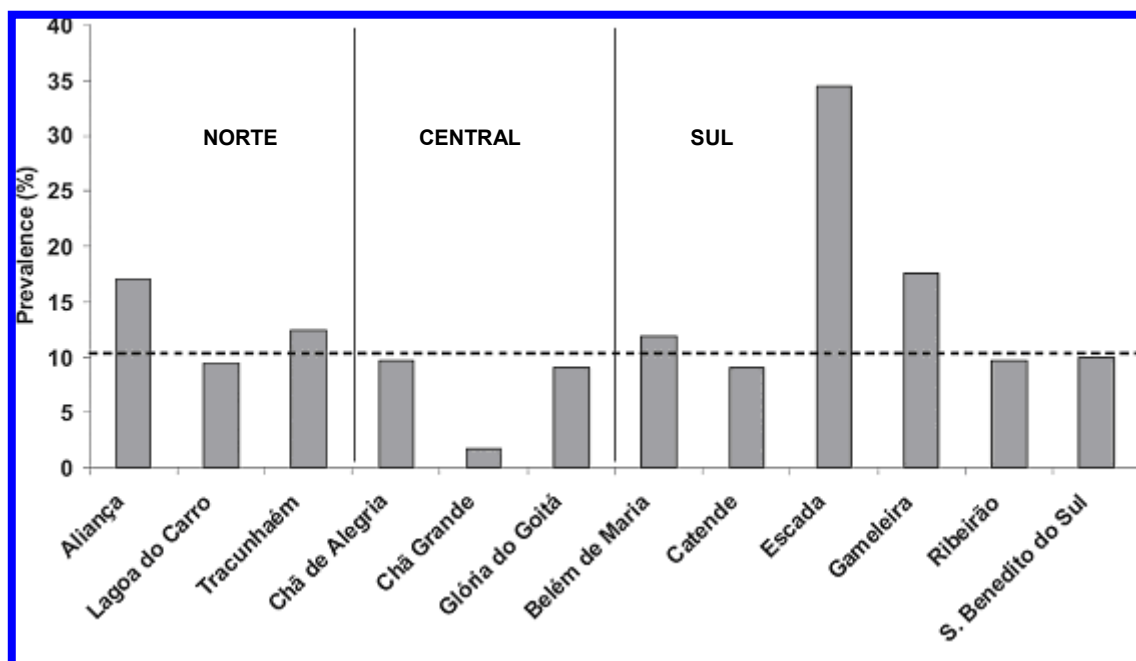


Figura 04: Prevalência de infecção por *Schistosoma mansoni* na Zona da Mata do Estado de Pernambuco, Nordeste Brasil. A linha tracejada indica o limite mais baixo (10%) para a moderada prevalência da esquistossomíase (FAVRE et al., 2006)

A esquistossomose em Pernambuco abrange todas as faixas de idade. No grupo de 10-20 anos as internações foram de 14,63%, o maior número de internações ocorreu na faixa de 60 anos acima, com percentual de 27,68%. Os óbitos por esquistossomose são raros para as idades abaixo de 20 anos, com 1,28%, subindo para 14,11% para o grupo de 40-50 anos, o maior número de óbito ocorreu na faixa de 60 anos acima, com o percentual de 51,18% (RESENDES et al., 2005).

3.5. Controle da esquistossomose

O controle da esquistossomose é uma das tarefas mais difíceis do serviço de saúde pública devido à ampla difusão do hospedeiro intermediário, dos métodos de controle falhos, da frequência do contato humano com a água em atividade agrícola, doméstica, ou por lazer, das limitações do tratamento individual e em massa, e principalmente pela falta ou pelo longo tempo para resultar em efetiva adesão da comunidade de uma educação sanitária, como forma preventiva de abordagem, a inexistência de vacina eficaz para a

prevenção da doença, as dificuldades políticas e econômicas relacionadas ao alto custo das obras de engenharia sanitária que possibilitem o aporte adequado de água para as casas e a adequada eliminação dos dejetos, de modo que seja impedida a contaminação dos recursos hídricos (RESENDES, et al., 2005; CARVALHO et al., 1998; COURA et al., 2004; KATZ, 1999). É através do controle da transmissão da esquistossomose que há a possibilidade de erradicação da doença, visando à interrupção do ciclo evolutivo do parasito (KATZ, 2003).

Até 1984, a estratégia de controle recomendada pelo WHO para a esquistossomose era centrada no combate ao caramujo. A partir deste ano, um comitê de especialistas da WHO, passou a recomendar o tratamento quimioterápico. Essa decisão foi motivada pelo surgimento do praziquantel (WHO, 1993).

Porém tem-se apenas uma certeza: a necessidade imperiosa de encontrar uma forma de combater a esquistossomose no mundo de forma segura e eficaz. Enormes progressos têm sido feito no controle da esquistossomose em vários países, com poucos recursos. Sabe-se que a distribuição da medicação não é a principal arma para o controle, mas sim um forte sistema de saúde pública que seja capaz de tratar o paciente e estabelecer medidas concretas de combate à doença (GRYSEELS et al., 2006).

3.6 Patogenia

O *S. mansoni*, vivendo no sistema porta hepático, faz a postura no intestino do hospedeiro, causando sintomatologia intestinal. A penetração das cercárias pode ser acompanhada de exantema, prurido e outras manifestações alérgicas locais. Também se observa, quando o esquistossômulo passa pelo pulmão, a ocorrência de bronquites ou pneumonias. Portanto, a esquistossomose pode se considerar uma doença de múltiplos mecanismos desencadeando lesões diretamente ligadas à presença local da forma evolutiva do parasito (NEVES, 2005).

O agente nocivo mais importante na esquistossomose é a eliminação de ovos, e este se apresenta como o elemento fundamental na patogenia desta parasitose. As lesões provocadas por estes são causadas pela sua localização nos tecidos e também pela eliminação dos antígenos solúveis secretados pelos poros presentes na casca. Os granulomas são lesões típicas, elemento anátomo-patológico básico do processo esquistossomótico crônico, que se forma em torno dos ovos do parasito. Apresentando durante seu desenvolvimento três fases: Em uma primeira fase, necrótica-exsudativa, observa-se uma zona de necrose em torno do ovo, e contornando essa área há um exudato de eosinófilos, neutrófilos e histiócitos. Na segunda fase chamada de produtiva ou de reação histiocitária, inicia-se uma reparação da área necrosada. E por fim, a fase de cura ou fibrose, na qual o granuloma endurecido é denominado nódulo, que pode seguir dois caminhos: calcificação do ovo ou a absorção e desaparecimento do granuloma (POLAK et al., 1959).

As lesões anátomo-patológicas produzidas no organismo humano pelo *S. mansoni* são as mais variáveis possíveis que vão desde a forma aguda ou toxêmica, onde ao redor do ovo depositado nos tecidos aparece área de necrose. A forma crônica leve pode se apresentar assintomática ou com sintomatologia discreta, com granulomas pequenos e bem delimitados, com tendência à cicatrização. A forma crônica grave é onde se observa a forma hepatoesplênica da esquistossomose; a esplenomegalia é em parte devido à congestão venosa como também da hiperplasia das células do sistema macrófago-linfocitário (PESSOA, 1988).

A mortalidade por esquistossomose ocorre principalmente na fase crônica da doença, em sua forma hepatoesplênica. Nessa forma, as manifestações clínicas da doença são decorrentes da hipertensão portal e as principais complicações são a ascite e a formação de varizes gastroesofágicas que, quando rompem, resultam em hemorragias graves e, muitas vezes, fatais (PRATA, 1997; BRASIL, 2006).

3.7 Imunopatologia na esquistossomose mansônica

O fígado é o principal órgão afetado pela esquistossomose. Durante a infecção o número de ovos tende a aumentar e com isso induzir a uma lesão granulomatosa. Após a morte dos ovos, forma-se a fibrose hepática a principal causa de mortalidade e morbidade na esquistossomose humana que envolve o espaço portal, devido a isso a resposta granulomatosa vêm sendo intensamente estudadas na patogênese da resposta imune celular do *S. mansoni*. Amiri e colaboradores (1992) avaliando camundongos que apresentavam uma imunodeficiência severa observaram que nestes animais não havia formação de granulomas, contudo eles apresentaram uma falência hepática, resultado da liberação das moléculas hepatotóxicas liberadas pelo ovo. Assim, o granuloma tem um papel hepatoprotetor por seqüestrar as hepatotoxinas secretadas pelos ovos (PHILLIPS e COLLEY, 1978).

A Inflamação granulomatosa na esquistossomose é uma hipersensibilidade mediada por células aos antígenos dos ovos do parasito que são apresentados no tecido hepático (WARREN et al., 1967). À medida que o granuloma evolui, fibras colágenas são depositadas em torno dos ovos, um processo que leva a fibrose (LENZI et al., 1999). Na fase crônica da infecção, devido a um número elevado de granuloma, sua confluência pode levar à hipertensão portal, hemorragias gastrointestinais, e em última análise, à morte (CHEEVER et al., 1997). Os granulomas são áreas de infiltrados celulares consistindo principalmente de eosinófilo, macrófago, fibroblastos e linfócitos. Em animais imunocompetentes a formação dos granulomas é orquestrada pela resposta das células T CD4⁺ (MATHEWS e BOROS, 1986; HERNANDEZ et al., 1997).

Na esquistossomose mansônica, existe uma dicotomia da resposta imune. Inicialmente, antes da oviposição, ocorre resposta Th1 (WYNN et al., 1993) nessa resposta temos citocinas produzidas com funções citotóxicas e , também induzindo hipersensibilidade do tipo tardia (KUBY, 2002). Após a deposição de ovos no fígado do hospedeiro, temos um aumento drástico de citocinas Th2 (GRYZCH et al., 1991). As células T CD4⁺ exercem a maior parte das funções auxiliares na resposta imune, frente a estímulos antigênicos, através das citocinas que secretam (KUBY 2002), os granulomas periovulares

são mediados especialmente por essas células (MATHEW et al., 1986). As citocinas secretadas pelas células T CD4⁺ podem apresentar dois padrões de respostas diferentes: Th1 e Th2.

A resposta padrão Th1 é iniciada pela produção precoce de IL-12 (acredita-se que esta interleucina é a principal responsável pela ativação da resposta Th1), produzida por macrófagos ativados pelo IFN- γ (Interferon gama), IL-2 (Interleucina-2) e linfotoxinas (BRUNET et al., 1998). Considerada como uma resposta pró-inflamatória apresenta níveis elevados de IL-1, IL-6, TNF- α (Fator de Necrose Tumoral α) (RIBEIRO DE JESUS et al., 2002). Esta resposta pode ser observada, a partir da análise de células PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) de pacientes com esquistossomose aguda que mostrou um aumento da população de células CD4⁺ e células Natural Killer (NK). A ativação destas células envolve a participação de IFN- γ , secretado pelas células NK. Este aumento de IFN- γ parece ter um importante papel na ativação de macrófagos que interagiriam com células T CD4⁺ durante o processo de diferenciação (CORREA-OLIVEIRA et al., 2000).

Existem evidências de que macrófagos ativados por IFN- γ destroem cercárias ao penetrar na pele, e esquistossômulos no pulmão, demonstrando assim uma resposta Th1 (SMYTHIES et al., 1996). Inicia-se desde a infecção, continuando pelo período da oviposição, cerca de cinco semanas após a infecção, quando também tem início da inflamação granulomatosa causada pelos ovos depositados (STADECKER e HERNANDEZ, 1998).

O granuloma atinge o seu maior tamanho durante a fase aguda da infecção, diminuindo na fase crônica (BOROS et al., 1975). Nesse processo são envolvidos vários mecanismos, incluindo alterações nos padrões de citocinas produzidas por células Th1 e Th2, com maior prevalência da resposta Th2 (FLORES VILLANUEVA et al., 1996 e MONTESANO et al., 1997).

O desenvolvimento de linfócitos Th2 é iniciado a partir da exposição de células T CD4⁺ nunca estimulada a IL-4, no início da resposta imune (LE GROS et al., 1990; SWAIN et al., 1990; SEDER e PAUL, 1994). Comparando os efeitos de diferenciação da IL-4 sobre as células T auxiliares são dominantes em relação aos efeitos da IL-12, isto implica que a partir do momento que a resposta Th2 é estimulada a resposta Th1 é inibida (SEDER e

PAUL, 1994). Outras citocinas ligadas à resposta Th2 são a IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e a IL-13 (BRUNET et al., 1998).

A IL-5 e a IL-10 desempenham papéis importantes na infecção. Quando estão ausentes durante a infecção aguda a IL-5 impede a eosinofilia, mas não tem nenhum efeito sobre o tamanho e a fibrose do granuloma (SHER, 1990). Sugerindo que a IL-5 desempenha um papel secundário na patogênese. Contudo, a IL-10 parece desempenhar um papel na regulação do tamanho do granuloma (FLORES-VILLANUEVA et al., 1996). Este fato levanta indícios de que a IL-10 diminui a quantidade das populações de células Th1 inflamatórias, ou torna-as anérgicas, levando a um desenvolvimento de uma resposta Th2 estável (SHER et al., 1991; FLORES-VILLANUEVA et al., 1996; REISER e STADECKER 1996).

Os macrófagos possuem funções na imunidade inata e como células efetoras atuam na imunidade adquirida. Os macrófagos que são ativados na resposta Th1 secretam mediadores inflamatórios, como o óxido nítrico (NO) (JORENS et al., 1995; MACMICKING et al., 1997).

Na infecção pelo *Schistosoma mansoni*, a ativação dos macrófagos pelo IFN- γ e por outros co-fatores induz à produção de NO pela reação enzimática. O NO torna-se uma molécula efetora, causando a morte do verme (JAMES 1995). Estudos demonstraram que a citotoxicidade dos macrófagos ativados não atua diretamente na superfície do parasito, mas sim inibindo a respiração celular, levando à morte (MCLAREN e JAMES, 1985).

A produção de NO tem seu pico após a oviposição dos vermes adultos no fígado. Sendo assim, com o início de resposta Th2 por parte do hospedeiro, a produção de NO decai, uma vez que a resposta Th1 foi inibida (BRUNET et al., 1999). Estudos em camundongos Knockout infectados em IL-4 demonstraram, através de uma polarização da resposta Th1, com alta produção de IFN- γ e NO após a oviposição, que a citocina IL-4 tem grande importância no controle de NO e na produção do granuloma, fazendo assim com que a sobrevivência do camundongo torne-se maior (PATTON et al., 2002).

3.8. Esquistossomose e vacina

As evidências de que o tratamento quimioterápico com o praziquantel é eficaz em reduzir a intensidade e prevalência da infecção são comprovadas na literatura. Para que os efeitos desses fármacos possam manter-se eficazes, devem ser administrados periodicamente por um espaço de tempo definido (KABATEREINE et al., 2007).

Além desse fato, há uma elevada taxa de reinfecção após o tratamento que limitam as estratégias baseadas unicamente na quimioterapia. Assim uma vacina profilática seria o método ideal para o controle da esquistossomose, sozinha ou associada ao tratamento quimioterápico (BERGQUIST et al., 2005). Uma vacina que promova uma resistência parcial para infecção com *Schistosoma* e levando a uma imunização de aproximadamente uma década torna-se mais barato que o tratamento em massa com o praziquantel para crianças com faixa etária de 6 a 15 anos (GUYATT e EVANS 1995; EVANS e GUYATT, 1997)

A vacina pode ser usada com duas finalidades: Para prevenir a doença ou reduzir a fecundidade do parasito. Uma redução no número de vermes seria a meta esperada no desenvolvimento de uma vacina anti-schistosoma, porém os ovos do *Schistosoma* são os grandes responsáveis pela patologia e a transmissão da doença. Assim uma vacina também seria eficaz contra o *Schistosoma* se interferisse na fecundidade do parasito e na viabilidade dos ovos (CAPRON et al., 2002).

Pesquisadores em esquistossomose da Organização Mundial de Saúde (WHO) determinaram que as vacinas contra esquistossomose deveria reduzir em, no mínimo, 50 % a reinfecção, depois do tratamento com o praziquantel em uma população susceptível, podendo assim ser eficaz na redução da morbidade e mortalidade causada pela doença (CHERFAS 1991; BERGQUIST et al., 2002).

Contudo o desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose é muito difícil devido à imunidade refratária do parasito, evidenciada pela sua extraordinária capacidade de sobreviver por décadas dentro da corrente sanguínea de um hospedeiro imunocompetente (SIDDIQUI et al., 2008).

Durante as últimas décadas, muitos laboratórios tentaram identificar antígenos de *Schistosoma* que induzissem, pelo menos, uma imunidade parcial. Mais de 100 antígenos vem sendo identificado, destes apenas 15 % apresentaram grau variável de proteção, contudo a imunidade alcançada por esses antígenos não alcançam níveis tão elevados (BERGQUIST et al. 2002; HEWITSON et al. 2005). Destes antígenos identificados a OMS elegeu seis antígenos prioritários baseada na eficácia de proteção: paramiosina, glutathion-s-transferase, ácidos graxos ligados a proteínas de 14 kDa, IrV-5, triose fosfatase isomerase e Sm23 (BERGQUIST et al., 1998). Os estudos clínicos do glutathion s-transferase do *S. haematobium* já se encontra na fase clínica II (CAPRON et al., 2005), embora os resultados da fase clínica I ainda não tenham sido publicados (SIDDIQUI et al., 2008). Contudo é importante inicialmente realizar uma avaliação cuidadosa sobre estes candidatos a vacinas que estão sendo identificados e examinar se eles apresentam um papel na sobrevivência do parasito e se seria viável sua aplicação nas áreas endêmicas (SIDDIQUI et al., 2008).

Contudo testes experimentais em antígenos oriundos de cercárias de *S. mansoni* que foram atenuados de radiação ionizante ao administrar uma única dose em camundongos induziram proteção entre 50-70 % e quando esses animais receberam de duas a três doses de imunização aumentou para 80 % (SMYTHIES et al., 1996, MINARD et al., 1978; STEK et al., 1981).

Apesar de todo o avanço nas pesquisas, atualmente, não existem vacinas eficazes disponíveis, contudo há uma extensiva busca na identificação de novos alvos para o ataque imunológico. Com os dados do projeto genoma disponível, há um grande incentivo para a busca de uma vacina eficaz (MCMANUS et al., 2004).

3.9.1. Fármacos com atividades esquistossomicida: passado, presente e futuro

A procura sistemática por fármacos quimioterápicos iniciou-se em meados de 1920 a partir de Kikuth e colaboradores (HARDER, 2002; KIKUTH e GOENNERT, 1948; SHEKHAR, 1991).

O primeiro tratamento quimioterápico contra o *Schistosoma* fora com os compostos antimoniais (Figura 05) introduzidos durante a primeira guerra mundial (BRENDLEY 1994). Entretanto, os compostos antimoniais foram abolidos dos tratamentos contra o *Schistosoma* por exigir um uso prolongado, bem como diversos efeitos colaterais, sendo em alguns casos reações graves (SKEHAR 1991, CIOLI 1995).

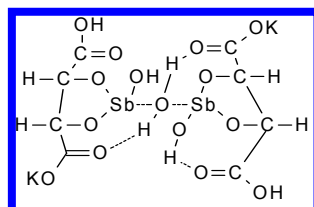


Figura 05 – Tartarato de antimônio e potássio

Ainda na década de 20 surgiu a emetina (Figura 06), porém devido às doses terapêuticas contra o *Schistosoma* serem muito altas, aproximando-se do limite de toxicidade e o fato de que os pacientes para fazer o tratamento tinham que estar internados em hospitais, não continuou a ser um fármaco de escolha para essa parasitose (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2006).

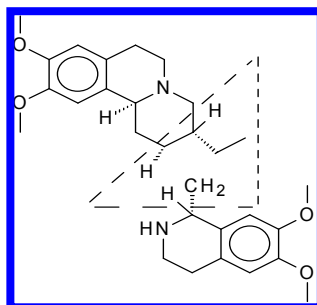


Figura 06: Emetina

Em 1932 surgiu na clínica contra a esquistossomose, o lucantona e o hicantona, este último apresentou um efeito três vezes maior que o lucantona (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 2006). O lucantona (Figura 07a) só é ativo quando administrado por via oral, este fármaco sofre metabolismo de primeira passagem no fígado, transformando-se em hicantona (Figura 07b) (CIOLI, 1995). Atualmente, não é mais usado na prática médica, devido a sua ação

irritante sobre a mucosa gastrointestinal, contudo esses fármacos representaram grande contribuição à quimioterapia de helmintíases, em razão de terem estimulado a pesquisa de novas substâncias isentas de antimônio (PESSOA 1988; CUNHA 1970).

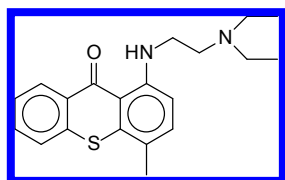


Figura 07a: Lucantona

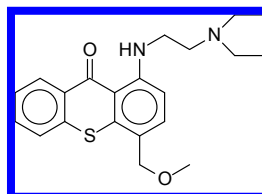


Figura 07 b: Hicantona

Em 1955, o metrifonato (Figura 08), um composto organofosforato usado inicialmente como inseticida, foi usado no tratamento da esquistossomose urinária. Apresentava boa tolerância e nenhum relato de efeitos colaterais graves, atuava como neurotransmissor inibindo a ação da acetilcolinesterase no tegumento do parasita, sendo ativo contra o *S. haematobium* (HARDER 2002; FELDMIEIER et al., 1999; SHEKHAR 1991). Em 1998, o metrifonato não constava mais na lista dos fármacos de escolha da Organização Mundial de Saúde para o tratamento da esquistossomose (WHO, 1998).

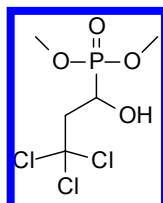


Figura 08: Metrifonato

Em 1960, surgiu o nitrofurano. Esse fármaco foi usado em pacientes na China, contra o *S. japonicum*, o mecanismo de ação no *S. japonicum* estava na inibição específica da enzima glicofosforilase fostatase do parasita. Contudo devido a sua alta toxicidade, fora abolido da clínica (CIOLI, 1995).

O niridazol surgiu em 1964, recebendo uma atenção maior, por ser uma das primeiras alternativas de tratamento administrado por via oral (Figura 09). Apresentou uma ótima eficácia contra o *S. haematobium*, efeito moderado contra o *S. mansoni*, e pouco ativo contra o *S. japonicum*. Contudo seu uso

tornou-se obsoleto devido aos sérios efeitos colaterais, como mutagenicidade e carcinogenicidade (HARDER, 2002).

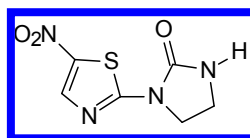


Figura 09: Niridazol

Na seqüência de descobertas, surgiu o oxamniquina, em 1969 (Figura 10). A toxicidade do oxamniquina é muito baixa, não apresenta efeitos colaterais graves. Possui ação sobre vermes adultos machos e fêmeas, além de apresentar atividade contra parasitas imaturos em ratos e macacos (CIOLI, 1995). É a droga de escolha para o tratamento de infecções por *S. mansoni* e pode ser administrado oralmente em seres humanos. O oxamniquina é relatado como excelente em programas de tratamento comunitário, especialmente na América do Sul. No Brasil, com o programa nacional para o controle da esquistossomose, mais de 10 milhões de indivíduos têm recebido oxamniquina, com ótimos resultados e com boa eficácia e tolerância (FOSTER, 1987; CAFFREY, 2007).

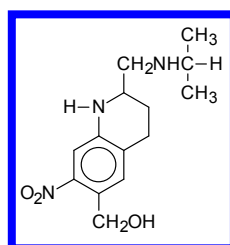


Figura 10: Oxamniquina

A tubercina (Figura 11) foi usada pioneiramente como agente esquistossomicida por Jaffe e colaboradores (1971). Sua administração era combinada com um inibidor de transporte de nucleosídeo de mamíferos, o NBMPR-P, para impedir que a tubercina entrasse nas células dos mamíferos. Esta combinação terapêutica foi muito eficaz em camundongos infectados, pois não causava uma toxicidade aparente no hospedeiro. Ela atua como um

análogo da purina, sendo incorporado pelo DNA do parasito (EL KOUNI et al., 1989).

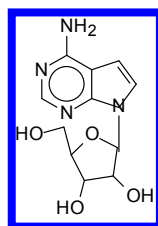


Figura 11: Tubericina

No final da década de 60, surgia o praziquantel (Figura 12). Sua descoberta se deu quando na busca por novos fármacos com atividades tranqüilizantes, E. Merck (Darmstadt, Germany) desenvolveu uma série de compostos possuindo um anel pirazino-isoquinolina (SEUBERT et al., 1977).

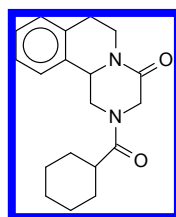


Figura 12: Praziquantel

Porém a atividade antiparasitária deste anel apenas começou a ser avaliada no início de 1970, no laboratório de Bayer, também na Alemanha (ANDREWS, 1983). Mais de 400 compostos foram sintetizados e testados (SEUBERT et al., 1977), embora quem melhor apresentou atividade anticestoda e antitrepatoda em animais foi o composto originalmente denominado EMBAY 8440 ou o praziquantel. Inicialmente, o praziquantel foi empregado para uso veterinário como agente cestocida chamado de Droncit e teve sua publicação em 1977 (THOMAS e GÖNNERT, 1977; GÖNNERT e ANDREWS, 1977). Foi patenteado em dezembro de 1973 na Alemanha. Bayer e Merck o patentearam em mais 38 países (WHO, 1999). Hoje, o praziquantel, denominado quimicamente 2-ciclo-hexil-carbonil-1,2,3,6,7,11b-hexaidro-4H-pirazino-[2,1-a]-isoquinolina-4-ona, é o fármaco de escolha no tratamento da esquistossomose, por uma série de razões, entre elas o fato de apresentar alta

eficácia contra todas as espécies de *Schistosoma* e contra os cestodas (FROHBURG, 1984).

A atividade esquistossomicida foi a primeira testada em animais, seguida de testes toxicológicos e farmacológicos (FROHBURG e SHENKING, 1981). Os primeiros estudos em voluntários humanos foram relatados em 1978 (LEOPOLD et al., 1978). Após esses primeiros estudos, foi criada uma cooperação entre Bayer com a Organização Mundial de Saúde (OMS) e realizada uma triagem clínica em multicentros na África, Japão, Filipinas e Brasil (DAVIS E WEGNER, 1979), em áreas endêmicas de *S. mansoni* (KATZ et al., 1979), *S. haematobium* (DAVIS et al., 1979), e *S. Japonicum* (ISHIZAKI et al., 1979).

Como os resultados desta triagem foram muito encorajadores e os testes toxicológicos indicavam a ausência de sérios efeitos colaterais a curto e longo prazo (FROHBURG, 1984), o praziquantel ganhou rapidamente a predominância na terapia esquistossomicida (CIOLI, 1995).

O praziquantel não impede a reinfecção e o tratamento repetido é geralmente uma prática comum em áreas endêmicas (MAGNUSSEN, 2003). Esse fato traz conseqüências que ameaçam a terapia contra a esquistossomose, uma doença que apresenta uma alta endemicidade, realizada apenas com um único fármaco. A possibilidade de surgimento de cepas resistentes ao praziquantel (SILVA et al., 2005), e a outra é a ineficácia do praziquantel nas manifestações agudas. Essas manifestações agudas ocorrem em indivíduos que nunca tiveram contato prévio com antígenos do schistosoma, e são infectados eventualmente quando viajam para áreas endêmicas (RIBEIRO DOS SANTOS et al., 2006).

No ano de 1976, surgiram dois candidatos a fármacos esquistossomicida, o Amoscanato e o Oltipraz. O amoscanato (Figura 13) se liga de forma covalente aos grupos de aminoácidos. Os vermes recuperados dos animais tratados apresentavam um severo dano no tegumento. O mecanismo de ação do amoscanato está na inibição da enzima AMPc-fosfodiesterase, afetando o metabolismo do glicogênio que é dependente dessa enzima (BUENDING et al., 1976; WALTER et al., 1984).

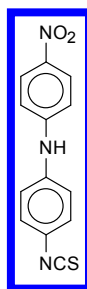


Figura 13: Amoscanato

O oltipraz (Figura 14) era ativo contra as três principais espécies de *Schistosoma*. Apresentava efeitos colaterais frequentes como dores abdominais, náuseas, diarreia. O tratamento não recebeu boa aceitação, sendo abolido em 1984. Modelos animais revelaram uma eficácia pequena e um período longo para a cura de dois meses (HARDER, 2002).

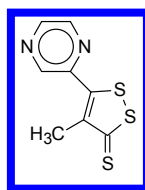


Figura 14: Oltipraz

O derivado benzodiazepínico Ro-11-3128 foi testado em humanos em 1978. Contudo apresentou um longo efeito sedativo em pacientes do sul da África. Atua imobilizando os esquistossômulos no estágio da infecção da pele e em estágios mais jovens, sendo eficaz no início da infecção. Ativo contra as espécies de *S. mansoni* e *S. haematobium* (SMITH et al., 1994).

Na década de 1980, pesquisadores evidenciaram que derivados da artemisinina, inicialmente usada para o tratamento da malária, também exibiam propriedade esquistossomicida. Administrando o artemeter (éter-metil de diidro-artemisinina), o arteeter (etil-éter de diidro-artemisinina) e o artesunato (hemi-succinato de artemisinina) em animais de laboratórios infectados com *S. japonicum* verificou-se a redução da carga parasitária em 80-100% (XIAO et al., 2000; UTZINGER et al., 2001). Apresenta uma boa tolerância quando administrado por via oral, porém o uso em massa não é recomendado em

áreas onde exista malária, a fim de evitar uma seleção de *Plasmodium* resistentes (UTZINGER et al., 2003).

A ciclosporina A, um agente imunossupressor, teve sua atividade antiparasitária descoberta por Bueding e colaboradores em 1981 (Figura 15). A descoberta se fez quando na tentativa de suprimir a formação de granulomas em camundongos infectados com *S. mansoni*, observaram uma drástica redução no número de vermes. Contudo, não é usada no tratamento da esquistossomose por não ter estabelecida uma dose esquistossomicida, principalmente devido a sua ação imunossupressora (CIOLI, 1995).

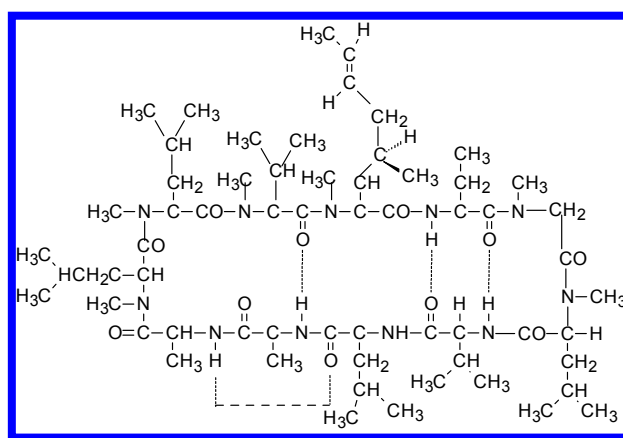


Figura 15: Ciclosporina A

Em 1986, a proantocianina, um extrato etanol/acetona da *Pavetta owariensis*, apresentou uma redução no número de ovos no intestino e no fígado de camundongos infectados. Os testes em humanos não constam na literatura (BALDE et al., 1989). Atualmente não há relatos na literatura consultada sobre avanços na pesquisa deste composto.

Um agente antitumoral, a procarbazina, nos testes *in vivo*, em 1989, apresentou uma ação esquistossomicida em vermes jovens, observando uma redução no número de ovos. Não se conhece a toxicidade nas doses esquistossomicidas, embora seja conhecida a ação citotóxica nas doses para o tratamento do câncer (BASCH e CLEMENS 1989).

Da década de 1990 até os dias atuais vêm surgindo vários candidatos a fármacos esquistossomicidas. Compostos com atuação em enzimas, como por exemplo, aqueles que atuam inibindo o HMG-CoA redutase (Enzima que limita

a velocidade na síntese de colesterol) o mevinolin (CHEN et al., 1990), outros que atuam interferindo na ação do AMPc, o imidazol apresentando uma ação no miracídio inibindo a motilidade (MATSUYAMA et al., 2004). Outros apresentam a inibição do AMPc-PK, atuando também sob os miracídios, envolvidos nos movimentos dos cílios (MATSUYAMA et al., 2004). O verapamil, um medicamento do grupo dos bloqueadores da entrada do cálcio, utiliza-se no tratamento da hipertensão arterial e da angina de peito. Produz uma supressão na oviposição por interferir na entrada de cálcio nas células vitelínicas. Ainda não há relatos do verapamil em humanos quando avaliada a atividade esquistossomicida, apenas em camundongos (BONN, 2004).

Derivados tioxoimidazolidínicos foram avaliados *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni* e verificou-se que na dose de 180 µg/mL o efeito máximo foi observado no 9º dia do experimento (ALBUQUERQUE, 2005). Um derivado arilazo-imidazolidínico apresentou uma mortalidade de 100 % dos vermes adultos de *S. mansoni* testados *in vitro*, na concentração de 29 µM nas primeiras 24 horas causando alterações no tegumento dos vermes como formação de bolhas, sendo estas alterações dose-dependente (PITTA et al., 2006).

3.9.2. Resistência ao praziquantel

Quando se afirma que uma população criou resistência a um determinado fármaco, significa que houve uma redução na sensibilidade ao fármaco após ter sido tratada por ele. Tolerância é uma insensibilidade ao fármaco inata, ou seja, onde a população não tinha tido contato prévio com o mesmo sendo esta vinda desde o nascimento (DOENHOFF et al., 2002).

Portanto, a resistência aos fármacos esquistossomicidas tem ocorrido e podem ser esperados devido o aumento e o uso continuado de agentes quimioterápicos (FALLON e DOENHOFF, 1994; YUE et al., 1990). O surgimento de *Schistosoma* potencialmente resistentes ao praziquantel foi demonstrado experimentalmente, onde vermes expostos a uma subdose terapêutica de praziquantel por várias gerações produziam parasitas menos sensíveis ao fármaco (FALLON e DOENHOFF, 1994). É interessante ressaltar que mais de

500.000 doses de praziquantel foram administradas na China para o tratamento da esquistossomose japônica desde 1980 (YUE et al., 1990).

A possibilidade de resistência ao praziquantel foi relatada inicialmente no Egito e Senegal. No Egito, 1607 pacientes infectados foram tratados com doses de 40 mg/kg, e duas semanas depois com a dose de 60 mg/kg, e foi observado que 2,4 % destes pacientes ainda havia a presença de ovos nas fezes (ISMAIL et al., 1996). Quando os ovos coletados destes pacientes, que apresentaram resistência, foram usados para infectar camundongos, 80 % destes animais apresentaram uma maior resistência na taxa de cura, sugerindo que os vermes descendentes desta infecção, respondiam com menos intensidade ao tratamento com o praziquantel (BOTROS et al., 2005). Confirmando a diminuição da resposta ao praziquantel *in vitro*, observou-se uma diminuição na contração muscular dos parasitos ao fármaco (ISMAIL et al., 1999), diminuição na lesão do tegumento (WILLIAM et al., 2001), bem como a diminuição na entrada de cálcio (WILLIAM e BOTROS, 2004).

No Senegal, no início dos anos 90, a redução na eficácia do praziquantel foi observada onde focos de infecção tiveram uma taxa de cura de apenas 18 a 36 %, onde a taxa esperada seria de 70 a 90 %, e a contagem de ovos reduziu de 77 a 88 % (STELMAN et al., 1995). Quando houve um aumento na dose de 40 para 60 mg/kg, não observou um aumento significativo na taxa de cura (GUISSE et al., 1997). Essas baixas taxas de cura para o praziquantel levantaram um forte indício de resistência ao fármaco, embora existam interpretações alternativas que discutam, justificando assim os elevados níveis de infecção prévia e a intensa transmissão da doença, que resulta em indivíduos com grandes números de parasitas jovens menos sensíveis ao fármaco, uma vez que o praziquantel não é ativo contra os vermes imaturos (DANSO-APPIAH, 2002). Outros estudos sugerem o surgimento de resistência ao praziquantel (ARAÚJO et al., 1996; BONESSO-SABADINI e DIAS 2002).

A comparação das propriedades dos focos isolados resistentes como, por exemplo, os do Senegal, podem ajudar na elucidação do mecanismo de ação do fármaco e a natureza da resistência. Esta pode ser devido ao retardamento na maturação do parasito, resultando no prolongamento dos estágios imaturos que são naturalmente resistentes ao praziquantel (REDMAN et al., 1996). A mutação ou a ausência de proteínas que atuam como

receptores do praziquantel (DAY et al., 1992). A insuceptibilidade dos isolados do Senegal, pode ser devido à ausência de anticorpos contra os antígenos de superfície que apresentam uma ação sinérgica com o sistema imune depois de tratado com o praziquantel (REDMAN et al., 1996).

Após o surgimento de relatos de cepas resistentes ao praziquantel, vem crescendo o número de autores que citam a necessidade de novos fármacos com atividade esquistossomicida. A Organização Mundial de Saúde em 1998, preocupada com a alta incidência de casos, convocou os pesquisadores a desenvolver novos fármacos para este fim. Trabalhos recentes como Gryseels e colaboradores (2006) e Moreira e colaboradores (2007), reforça a necessidade de novos fármacos esquistossomicida como alternativa de tratamento para as cepas resistentes ao praziquantel.

3.9.3. Imidazolidinas

O imidazol é o protótipo de uma série de heterocíclicos pentagonais aromáticos que apresentam em sua estrutura dois átomos de nitrogênio, tendo as imidazolidinas como um análogo estrutural do mesmo (BARREIROS e FRAGA, 2001). O sistema anelar imidazolidínico foi descoberto por Bayer (1861), durante suas pesquisas com o ácido úrico, desde então este sistema tem sido intensivamente estudado (Figura 16) (FINKBEINER, 1965; BATEMAN, 1980).

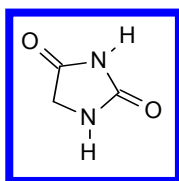


Figura16: Estrutura da Imidazolidina-2,4-diona

Ao sofrer modificações estruturais, esse anel produz uma diversidade de atividades biológicas originando derivados imidazolidínicos bioativos (JONES, 1982).

Atividades biológicas mais diversas foram observadas em compostos contendo o anel imidazolidínico. Derivados contendo a estrutura 2-tioxo-

imidazolidina-4,5-diona possuem atividade herbicida (STOFFEL *apud* OZKIRIMLI e HAMALI, 1995), tuberculostática (MIZZONI *apud* OZKIRIMLI e HAMALI, 1995) e sedativa (DANIELSON *apud* OZKIRIMLI e HAMALI, 1995). A partir dessas observações, Ozkirimli e Hamali (1995) sintetizaram e testaram a atividade hipnótico-sedativa de derivados 2-tioxo-4,5-imidazolidinônicos, tendo os compostos 1-(arilideno-amino)-3-ciclo-hexil-2-tioxo-imidazolidina-4,5-dionas (Figura 19) maior atividade.

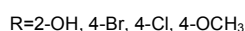
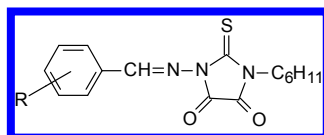
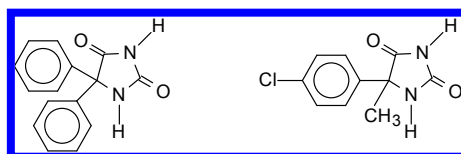


Figura 17 - Derivados 1-(arilideno-amino)-3-ciclo-hexil-2-tioxo-imidazolidina-4,5-dionas

O sistema imidazolidínico também possui propriedade antifúngica e antibacteriana (MARTON et al., 1993), propriedades hipnóticas (HENZE e SMITH, 1943), atividade hipoglicêmica (WARE, 1950; SOLIMAN et al., 1981).

Em 1954, Luttermoser e Bond observaram que a partir de modificações estruturais na imidazolidina-2,4-diona, obtiveram a 5,5-difenil-imidazolidina-2,4-diona (**a**) e a 5-(*p*-clorofenil)-5-metil-imidazolidina-2,4-diona (**b**) (Figura 17), e estas apresentavam atividade frente a vermes adultos de *S. mansoni* de ratos infectados.



a

b

Figura 18 – (**a**) 5,5-Difenil-hidantoína e (**b**) 5-(*p*-clorofenil)-5-metil-hidantoína

A atividade esquistossomicida também foi observada por Werbel e colaboradores (1977) ao avaliarem a 5-(2,4,5-tricloro-fenil)-imidazolidina-2,4-diona e por Benazet e colaboradores em 1974 ao avaliarem a 1-(5-nitro-tiofeno-3-il)-2-tioxo-imidazolidina (Figura 19).

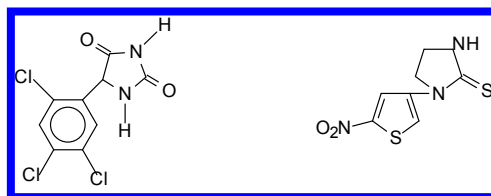


Figura 19 – (a) 5-(2,4,5-tricloro-fenil)-hidantoína e (b) 1-(5-nitro-tiofeno-3-il)-2-tioxo-imidazolidina

As imidazolidinas tiveram no passado um representante na clínica médica como um fármaco de ação comprovada frente a vermes adultos de *S. mansoni*, o niridazol (Ambilhar®) quimicamente denominado 1-(5-nitro-tiofeno-3-il)-imidazolidin-2-ona (Figura 09) (CATTO; TRACY; WEBSTER, 1984).

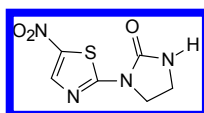


Figura 09: Niridazol

A propriedade esquistossomicida *in vitro* frente a vermes adultos de *S. mansoni* dos derivados imidazolidínicos foi relatada por Oliveira e colaboradores (2004) e Albuquerque e colaboradores (2006).



ESTUDO QUÍMICO

4. SÍNTESE DOS DERIVADOS IMIDAZOLIDÍNICOS

As moléculas em estudo foram sintetizadas no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) da Universidade Federal de Pernambuco, sob a responsabilidade dos Professores Ivan da Rocha Pitta, Maria do Carmo Alves de Lima e Suely Lins Galdino, sendo disponibilizadas em quantidades suficientes para este estudo.

4.1. MATERIAL E MÉTODOS

Para a síntese e a comprovação estrutural dos novos derivados bioisósteros das séries 5-benzilideno-3-benzil-imidazolidínicos (LPSF/MS e LPSF/PT) e 5-arilazo-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT) utilizaram-se reagentes específicos, solventes, placas cromatográficas e equipamentos.

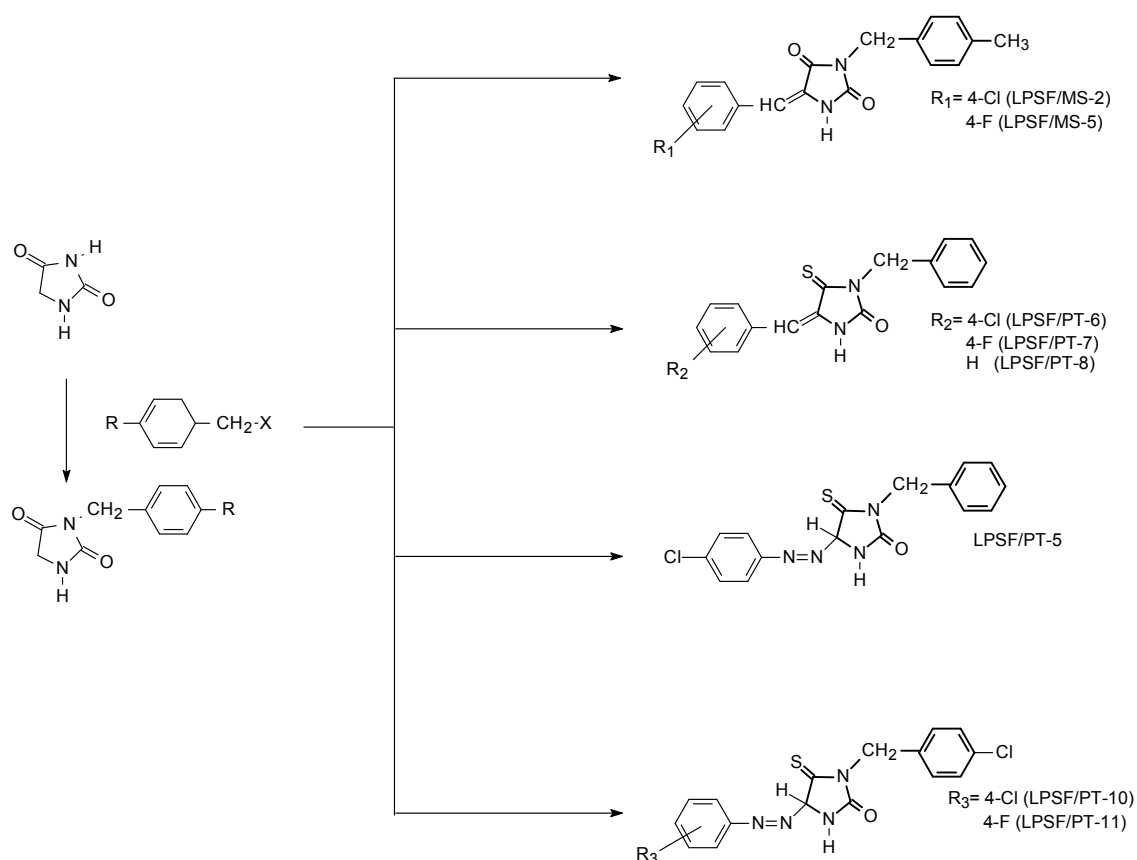
Os reagentes e solventes que foram utilizados na síntese dos compostos e para suas análises pertencem às marcas Sigma/Aldrich, Acros, Merck, Vetec ou Quimis. Foram utilizados: 4-cloro-anilina; 4-flúor-anilina; benzaldeído; 4-cloro-benzaldeído; 4-flúor-benzaldeído; ácido clorídrico; acetato de etila; benzeno; imidazolidina-2,4-diona; pentassulfeto de fósforo; nitrito de sódio; etanol; *n*-hexano; piperidina; cloreto de benzila; brometo de 4-metil-benzil; brometo de 4-cloro-benzil; hidróxido de potássio.

Na cromatografia em camada delgada foram utilizadas placas de sílica gel 60 Merck F₂₅₄, de 0,25 mm de espessura, reveladas em luz ultravioleta (254 ou 366 nm) ou através de vapores de iodo. Para determinação dos pontos de fusão foi utilizado aparelho Quimis Modelo 340.27.

4.1.1. METODOLOGIA

O Esquema 01 apresenta as moléculas imidazolidínicas das séries 5-benzilideno-3-benzil-imidazolidínicos (LPSF/MS), 5-benzilideno-3-benzil-4-

tioxo-imidazolidínicos (LPSF/PT) e 5-arilazo-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT).



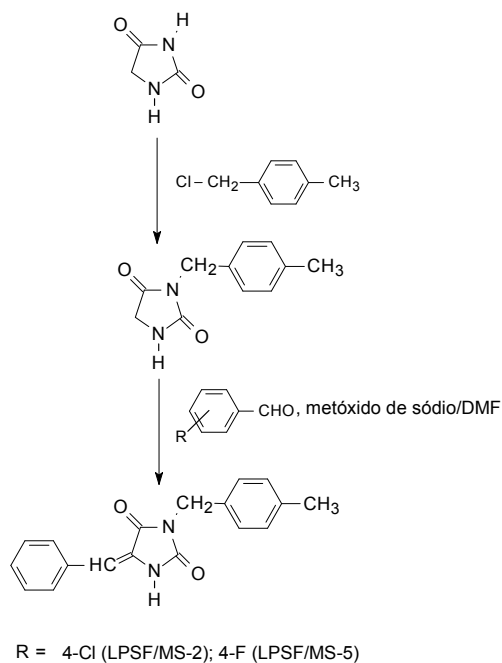
Esquema 01: Moléculas imidazolidínicos LPSF/MS00 e LPSF/PT

4.2.1. PROCEDIMENTO

4.2.1.1. Derivados 5-benzilideno-3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS)

Os derivados 5-benzilideno-3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS) foram obtidos através de duas etapas. Inicialmente, imidazolidina-2,4-diona reagiu com cloreto de 4-metil-benzil para formação da 3-(4-metil-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS00). Os derivados 5-benzilideno-3-(4-metil-

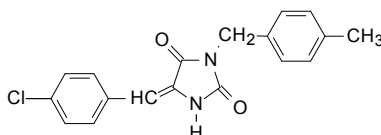
benzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS) foram obtidos a partir da reação de condensação de Knoevenagel da 3-(4-metil-benzil)-imidazolidin-2,4-diona (LPSF/MS00) com benzaldeídos substituídos na presença de metóxido de sódio recém preparado e dimetilformamida, como solvente, conforme o Esquema 02.



Esquema 02: Diagrama de síntese dos derivados da série 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS)

4.2.1.1.1 Características Físico-químicas dos derivados 5-benzilideno-3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS)

- ✓ **5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS02) (CARVALHO, 2005)**



C₁₈H₁₅ClN₂O₂

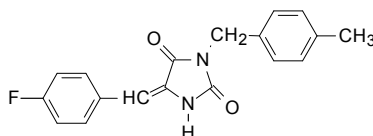
M.M. = 326

P.F. = 221-222°C

Rdt = 29,5%

Rf = 0,50 (n-hex/AcoEt 7:3)

- ✓ **5-(4-fluor-benzilideno)-3-(4-metil-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS05) (CARVALHO, 2005)**



C₁₈H₁₅FN₂O₂

M.M. = 310

P.F. = 181-183°C

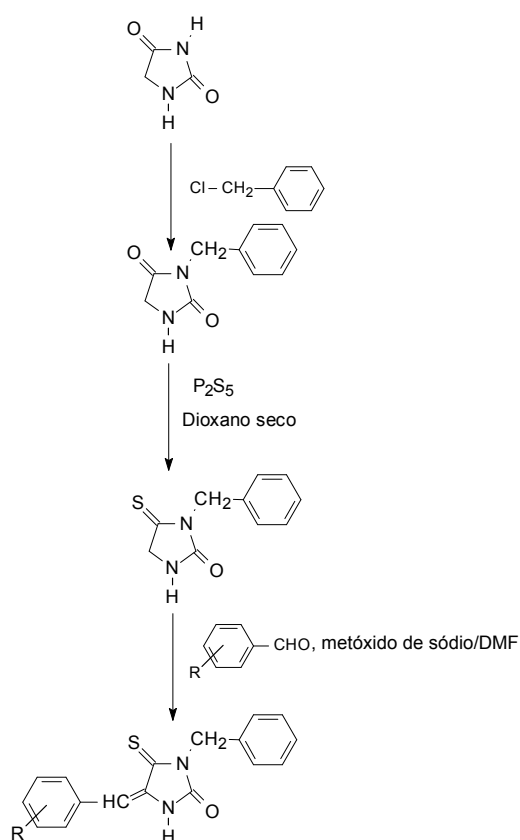
Rdt = 29,52%

Rf = 0,54 (n-hex/AcoEt 7:3)

4.2.2. Derivados 5-benzilideno-3-benzil-4-tioxi-imidazolidin-2-ona

(LPSF/PT)

Os derivados 5-benzilideno-3-benzil-4-tioxi-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT) foram obtidos através da mesma metodologia utilizada para os derivados LPSF/MS. A 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/NE00) reagiu com P_2S_5 para formação do derivado 3-benzil-4-tioxi-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT02). Este intermediário reagiu com benzaldeídos substituídos na presença de metóxido de sódio recém preparado e dimetilformamida, como solvente, conforme o Esquema 03.

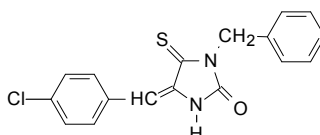


R = 4-Cl (LPSF/PT-6); 4-F (LPSF/PT-7); H (LPSF/PT-8)

Esquema 03: Diagrama de síntese dos derivados da série 5-benzilideno-3-benzil-4-tioxi-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT)

4.2.2.1. Características Físico-químicas dos derivados 5-benzilideno-3-benzil-4-tioxi-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT)

- ✓ **5-(4-cloro-benzilideno)-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona**
(LPSF/PT06) (ROCHA-FILHO, 1993)



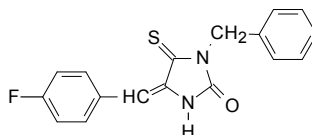
M.M. = 328,5

P.F. = 222-223 °C

Rdt = 82,5%

Rf = 0,65 (Benz/AcoEt 95:5)

- ✓ **5-(4-flúor-benzilideno)-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona**
(LPSF/PT07) (ROCHA-FILHO, 1993)



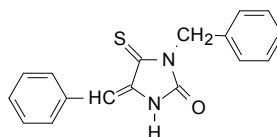
M.M. = 312

P.F. = 216-217°C

Rdt = 80,5%

Rf = 0,54 (Benz/AcoEt 95:5)

- ✓ **5-benzilideno-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT08)**
(ROCHA-FILHO, 1993)



M.M. = 294

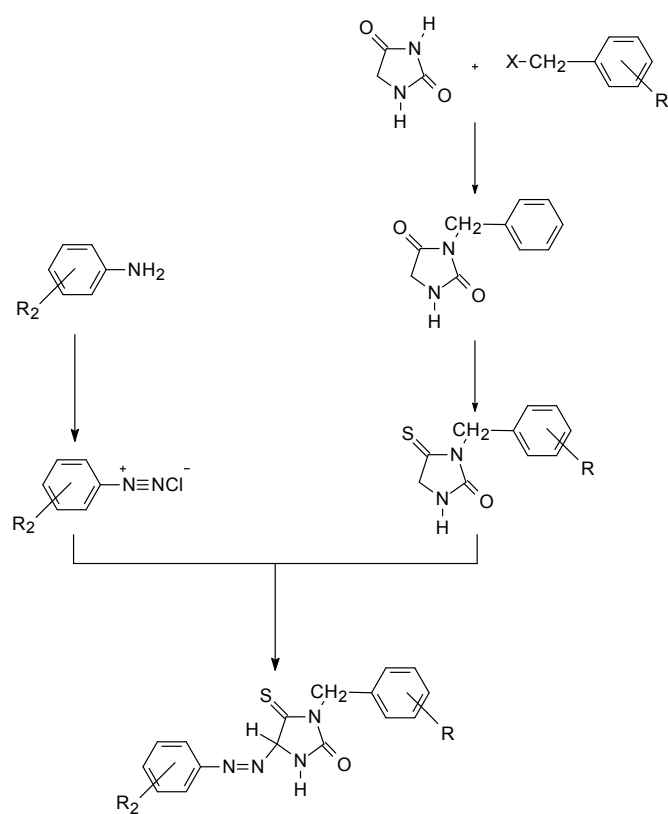
P.F. = Decomposição

Rdt – 56,5%

Rf = 0,49 (Benz/AcoEt 95:5)

4.2.3. Derivados 5-arilazo-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT)

Os derivados 5-arilazo-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT) foram obtidos em três etapas. Inicialmente, obteve-se a 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/PT) por reação da imidazolidina-2,4-diona com cloreto de benzil ou cloreto de 4-cloro-benzil. Numa segunda etapa, a 3-benzil-imidazolidina-2,4-diona reagiu com P_2S_5 para formação do derivado 3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT02 e LPSF/JU02). Finalmente, a anilina substituída em meio ácido e na presença do nitrito de sódio produziu um sal diazônio, que reagiu com o 3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT02 e LPSF/JU02) conduzindo a formação dos compostos finais 5-arilazo-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT05, LPSF/PT10 e LPSF/PT11) (Esquema 04).



R₁ = H, R₂ = 4-Cl (LPSF/PT-5)

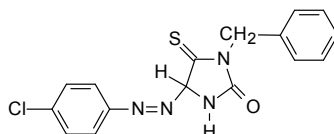
R₁ = 4-Cl, R₂ = 4-Cl (LPSF/PT-10)

R₁ = 4-Cl, R₂ = 4-F (LPSF/PT-11)

Esquema 04: Diagrama de síntese dos derivados LPSF/PT

4.2.3.1. Características Físico-químicas dos derivados 5-arilazo-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT)

- ✓ **5-(4-cloro-arilazo)-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT05) (ROCHA-FILHO, 1993)**



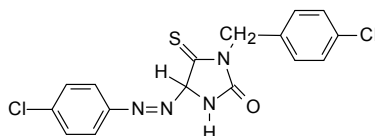
M.M. = 344,5

P.F. = 233-234°C

Rdt = 71,2%

Rf = 0,45 (CH₂Cl₂)

- ✓ **5-(4-cloro-arilazo)-3-(4-cloro-benzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT10) (SOARES, 2004)**



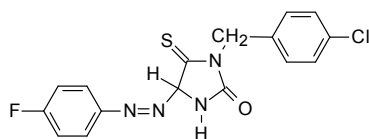
M.M. = 379

P.F. = 219-220°C

Rdt = 73%

Rf = 0,54 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)

- ✓ **5-(4-flúor-arilazo)-3-(4-cloro-benzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona**
(LPSF/PT11) (SOARES, 2004)



M.M. = 362, 5

P.F. = 225°C

Rdt = 65, 5%

Rf = 0, 63 (CH₂Cl₂/MeOH 9:1)



ESTUDO BIOLÓGICO

5. Material e Métodos

O procedimento experimental recomendado para avaliação da suscetibilidade *in vitro* do *S. mansoni* está de acordo com os trabalhos desenvolvidos por Badr e colaboradores (1999) e Barth e colaboradores (1996). Os experimentos estão de acordo com a Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE, processo nº009645/2006-23.

5.1. Material e Equipamentos

Na avaliação da atividade esquistossomicida dos novos derivados imidazolidínicos foram utilizados:

- Autoclave (SAKURA), balança analítica (NEO CLAVE ASV3001), câmara de fluxo laminar (DALTON), estufa com atmosfera úmida com 5 % de CO₂ (SANYO), microscópio invertido 60 x (OLYMPUS), lupa de aumento (LEICA), microscópio óptico (OLYMPUS)
- Moluscos *Biomphalaria glabrata* - foram procedentes do moluscário da Disciplina de Parasitologia, do Departamento de Medicina Tropical da UFPE;
- Camundongos Albinos Swiss (*Mus musculus*) - foram adquiridos do Biotério do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, e mantidos no Biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – UFPE.
- *Schistosoma mansoni* - cepa BH (Belo Horizonte), mantida no setor de Esquistossomose Experimental do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – UFPE.
- Anticorpos biotinilados [Anti-INF- γ , anti-IL4, anti-IL10, cedidos pelo laboratório de Imunologia da Universidade de São Paulo (USP).

- Derivados das séries:
 - 5-benzilideno-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT)
 - 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS)
 - 5-arilazo-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT)

5.2. Avaliação da suscetibilidade *in vitro* do *Schistosoma mansoni* frente a derivados imidazolidínicos

5.2.1 Obtenção de miracídios e infecção de moluscos do gênero *Biomphalaria*

Após obtenção de fezes de camundongos com 50 dias de infecção com *S. mansoni*, o material foi homogeneizado em água destilada, filtrado em dupla camada de gaze e deixado sedimentar em geladeira. Após três lavagens do sedimento, este foi colocado em placa de Petri sob iluminação artificial, por 30 minutos, a aproximadamente 28 °C. Após este período, a placa foi levada à lupa para verificar a presença de miracídios.

Os miracídios eclodidos foram contados e capturados utilizando-se lupa e pipeta Pasteur. Grupos de cinco a dez miracídios foram colocados em recipientes de vidro com capacidade para 100 mL. Moluscos *Biomphalaria*, medindo em torno de 10 mm de diâmetro, foram expostos individualmente a cada grupo de miracídios durante duas horas. Decorrido esse tempo, os moluscos foram mantidos em aquários. Após 45 dias de infecção, os moluscos foram expostos à fonte luminosa para eliminação de cercárias (STANDEN, 1952).

5.2.2. Infecção de camundongos com cercárias de *Schistosoma mansoni*

Para a avaliação *in vitro* foram utilizados camundongos fêmeas Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 20-25g. A infecção com cercárias foi realizada a partir da exposição das cercárias do parasito utilizando-se a técnica da imersão da cauda. Os camundongos foram expostos pela cauda à suspensão cercariana, contendo aproximadamente 80 cercárias por animal (OLIVIER e

STIREWALT, 1952). O procedimento experimental para a avaliação *in vivo* seguiu de forma similar ao experimento *in vitro*, contudo os animais foram expostos a uma carga de cercárias de 100. Após duas horas, os animais foram devolvidos as suas respectivas gaiolas. Em uma segunda etapa, realizou-se a perfusão.

5.2.3. Obtenção de Vermes adultos de *S. mansoni*

A obtenção de vermes adultos de *S. mansoni* é através da perfusão do sistema porta-hepático dos camundongos após 45-50 dias da infecção (DUVALL e DEWITT, 1967). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, em seguida colocados em decúbito dorsal expondo o aparelho digestivo, a veia cava foi seccionada e através de injeção intracardiaca com solução salina estéril, os vermes foram expulsos e coletados em placas de Petri contendo meio de cultura RPMI 1640.

Os animais sacrificados seguiram para incineração.

5.2.4. Avaliação da suscetibilidade *in vitro* do *Schistosoma mansoni*

Após remoção dos vermes de *S. mansoni* do hospedeiro definitivo (camundongo), os mesmos foram lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20 mM pH = 7,5 e suplementado com penicilina (100 UI/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e soro fetal bovino a 10%. Em seguida, os vermes adultos foram transferidos para placas de cultura de tecidos contendo 24 poços com capacidade para 2 mL de meio. Cada poço recebeu dois vermes (casal) e em seguida foram incubados em estufa a 37 °C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após um período de duas horas de adaptação ao meio, os derivados imidazolidínicos foram adicionados em concentrações variando de 60 a 240 µg/mL. Foram realizadas duplicatas para cada concentração utilizada. Os parasitos foram mantidos durante cinco dias sendo monitorados com o auxílio de um microscópio invertido a cada 24 horas para avaliação do seu estado geral: atividade motora, alterações no tegumento, taxa de mortalidade e pareamento (BADR et al., 1999 e BARTH et al., 1996). De acordo com Mercer em 1985, após o quinto dia de observação os ovários e as glândulas vitelinas

dos vermes adultos fêmeas começam a degenerar, esse tempo de cinco dias também fora relatado por Ridi e colaboradores em 1997.

5.3. Avaliação da suscetibilidade *in vivo* do *Schistosoma mansoni* frente aos derivados imidazolidínicos

O procedimento experimental recomendado e utilizado neste trabalho para avaliação da suscetibilidade *in vivo* do *S. mansoni* está de acordo com os trabalhos desenvolvidos por Pellegrino e Faria (1965), Katz e colaboradores (1966); Katz e Pellegrino (1973).

A confirmação da carga parasitária dos animais foi constatada a partir do exame parasitológico, método Kato-Katz. O método Kato-Katz foi escolhido por ser esse um método qualitativo e quantitativo, uma vez que determina a quantidade de ovos em um grama de fezes (Tabela 02). O Método permite realizar um cálculo, que determina a quantidade de ovos por grama de fezes seguindo a seguinte fórmula:

$$\text{Nº de ovos da amostra} = \text{nº de ovos encontrados na lâmina} \times \text{o fator 23.}$$

Seguindo o critério da OMS, que determina a intensidade da infecção de acordo com a carga parasitária como está demonstrado na tabela 05.

Tabela 02: Intensidade de infecção de acordo com a carga parasitária

Tipo de infecção	Nº de ovos por lâmina	Nº de ovos por grama de fezes	Incidência de Hepatomegalia
Leve	1 a 4	24 a 96	Rara
Moderada	5 a 33	120 a 792	Frequente
Intensa	> 33	> 800	Quase sempre

REY, 2002.

5.3.2. Tratamento dos camundongos infectados

Para cada composto imidazolidínico a ser avaliado foram utilizados grupos formados por um total de 40 camundongos fêmeas pesando entre 20-25g. Cada grupo com 10 animais, receberam doses diferentes do derivado

imidazolidínico que variaram entre 3, 10, 100 mg/kg de peso corpóreo, por gavagem. O grupo controle formado por 10 animais receberam o veículo sem a droga. Após o 15º dia do último dia do tratamento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Para a realização da cultura de esplenócitos foi feita a remoção do baço dos camundongos, Também foram coletados os fígados e intestinos para a avaliação histopatológica.

5.3.3. Preparações para administração oral do derivado imidazolidínico LPSF/PT05

Após 50 dias de infecção três grupos de dez animais, foram tratados com doses que variaram entre 3 a 100mg/kg de peso e um grupo controle contendo dez animais no qual foi administrado apenas o veículo. A administração foi feita por gavagem, por cinco dias consecutivos. O grupo controle foi tratado nas mesmas condições, exceto a droga, durante o mesmo período. Foram realizados três experimentos nos quais os veículos usados foram Tween 80, para suspender a droga, e completamos o volume necessário com solução salina, um segundo experimento realizado fora com emulsão Tween/óleo/água 30%, e no terceiro tivemos uma dispersão sólida de LPSF/PT05 em PEG (Polietilenoglicol). O volume acrescido foi calculado para que em no máximo 0,5 mL de salina contenha a concentração desejada.

A suscetibilidade do *S. mansoni* aos derivados imidazolidínicos foi avaliada através da contagem do número de ovos nas fezes, do número de vermes recuperados após perfusão do sistema porta-hepático e da alteração do oograma.

5.3.3.1. Preparação

5.3.3.1.1. Preparação da Emulsão óleo-água 30 %

O preparo da emulsão está de acordo com Zanin e colaboradores (2002). O tensoativo utilizado foi o monoleato de polioxietilenosorbitano (Tween

80), onde inicialmente os derivados avaliados foram solubilizados. A fase oleosa foi composta com óleo de soja comercial Sadia[®] (Lote: 00427).

As emulsões foram preparadas por aquecimento em banho-maria elétrico a 75 °C das fases aquosas e oleosas separadamente, depois de aquecidas as fases, foi adicionado o derivado com tween 80 na fase oleosa, posteriormente unida à fase aquosa e mantidas sob agitação manual e aquecimento por quinze minutos. Após ser retirada do banho-maria, a agitação manual foi mantida por mais 15 minutos em temperatura ambiente. E estocada na geladeira com temperatura de 15 ° durante os cinco dias de administração.

5.3.3.1.2. Preparação da suspensão base para a dispersão sólida do LPSF/PT05 em PEG.

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

A dispersão sólida do LPSF/PT05 em PEG 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 imidazolidínico LPSF/PT05. O grupo controle recebeu a mesma percentagem de PEG, disperso na suspensão base.

5.3.4. Oograma

Para realização do oograma foram utilizados três fragmentos de aproximadamente dois cm da porção distal do intestino, que foram lavados em solução salina e ligeiramente secados em papel absorvente. Posteriormente foram comprimidos entre lâmina e lamínula para realização da leitura (PELLEGRINO e FARIA, 1965). Os fragmentos foram microscopicamente analisados e 300 ovos, por camundongos, contados e classificados de acordo

com os seus estádios de desenvolvimento. Foi considerado alterado o oograma que apresentou ausência de uma das fases evolutivas do ovo do parasito (PELLEGRINO e KATZ, 1969).

5.3.5. Número de vermes recuperados nas veias intra-hepática e mesentéricas

O procedimento experimental utilizado para avaliar a eficácia do derivado avaliado *in vivo* foi baseado no número de vermes recuperados do grupo controle e do grupo tratado. A redução no número de vermes foi determinada a partir da seguinte equação (KEMP et al., 1956).

$$\frac{\text{Vermes Controle} - \text{Vermes Tratados}}{\text{Vermes Controle}} \times 100$$

A partir desse cálculo temos a avaliação da redução do número de vermes para cada dose avaliada.

5.3.6. Avaliação do efeito do derivado LPSF/PT05 na regulação da resposta imune celular de camundongos infectados com *Schistosoma mansoni*

5.3.6.1. Culturas de células esplênicas

As suspensões de células esplênicas foram obtidas por maceração dos baços em meio RPMI 1640, acrescido de antibióticos (Penicilina 100 UI/mL e Estreptomicina concentração final de 100 µg/mL) e aminoácido (L-glutamina), e centrifugadas por cinco minutos a 300 x g, a 4°C. As hemácias foram lisadas pela adição de água estéril ao precipitado por 18 segundos. As células foram então ressuspensas em meio RPMI suplementado com 5% de SBF (Soro Bovino Fetal), e a viabilidade observada pelo emprego de *Trypan Blue* a 10%. As suspensões celulares foram distribuídas em placas de cultura de 48 poços, em duplicata, na concentração de 5×10^6 células/mL e submetidas a diferentes tratamentos: MEIO (sem estímulo), SEA (antígeno solúvel de ovo) e SWAP

(antígeno solúvel de verme) na concentração de 20 µg/mL, e Con A (Concanavalina A) na concentração de 5 µg/mL e cultivadas por 24 e 72 horas a 37°C a 5% de CO₂, para obtenção de sobrenadante e posterior dosagem de citocinas e óxido nítrico.

5.3.6.2. Dosagem de citocinas

As placas para realização do ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) foram sensibilizadas com anticorpos de captura [anti-INF γ (XMG 1.2, a 2 µg/mL), anti-IL4 (BVD1D11 a 1 µg/mL), anti-IL10 (2A5, a 4 µg/mL)], diluídos em PBS (Tampão Salina Fosfato 0,01M pH 7,2) sendo distribuídos 50 µL em cada poço da placa e incubadas à temperatura de 4°C por 18 h. Em seguida, as placas foram bloqueadas com 80 µL de uma solução de PBST (Tampão salina fosfato com 0,05% de Tween 20) e 10% de SBF por 30 minutos.

Após este período, as placas foram lavadas três vezes com PBST e, em seguida, adicionados 50 µL dos respectivos padrões recombinantes de camundongos: rIFN- γ , rIL-10 e rIL-4 diluídos nas concentrações indicadas pelo fabricante ou amostras dos sobrenadantes em duplicata de cada poço da cultura de células. Os padrões foram distribuídos no volume de 100 µL nos primeiros poços nas concentrações iniciais de 20 ng/mL para rIFN- γ , de 10 ng/mL para rIL-10 e de 10 ng/mL para rIL-4 e feitas diluições seriadas até as concentrações de 0,625 ng/mL, 0,3125 ng/mL e 0,3125 ng/mL, respectivamente para cada citocina com PBS contendo BSA 0,1% (Soro Albumina Bovina) e as amostras foram distribuídas sem diluição. As placas foram então incubadas a 4°C por 18 horas. Após esta incubação, as placas foram lavadas com PBST e 50 µL dos segundos anticorpos biotinilados [anti-INF γ (AN18, a 1 µg/mL), anti-IL4 (BVD624G2, a 1 µg/mL), anti-IL10 (SXC1, a 2 µg/mL)] (cedidos pelo laboratório de Imunologia da Universidade de São Paulo), diluídos com PBST e 0,1% de BSA, foram adicionados seguidos de incubação à temperatura ambiente por uma hora. Após esta incubação, cada placa foi novamente lavada três vezes com PBST e o conjugado enzimático diluído 1:8000 (estreptoavidina marcada com peroxidase) em PBST contendo BSA 0,1, e incubadas à temperatura ambiente por uma hora. As placas foram

lavadas e a reação revelada pela adição do substrato contendo H_2O_2 e o cromógeno ABTS, ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazol-6-sulfônico, dissolvidos em tampão citrato 0,1 M e fosfato de sódio 0,2 M pH = 5,5. A reação foi bloqueada com ácido cítrico 0,2 M e a leitura realizada em leitor de ELISA, em comprimento de onda de 405 nm.

As concentrações de citocinas nos sobrenadantes foram calculadas a partir de curvas-padrão, obtidas com concentrações de 0,625 a 10 ng/mL de rINF- γ , 0,625 a 10 ng/mL de rIL-4 e 0,625 a 10 ng/mL de rIL-10. Os resultados foram apresentados como as médias aritméticas $\pm$ desvio padrão (DP).

5.3.6.3. Dosagem de óxido nítrico (NO) pelo método de Griess

Este método mede indiretamente a produção de óxido nítrico (NO) pela determinação do nitrito acumulado no sobrenadante da cultura (GREEN et al., 1982). As amostras e o padrão (NaNO_2 -251-4) são colocados em placas de vinil nas concentrações determinadas, diluídas em meio RPMI 1640 com 5% de SBF. Em seguida, adicionado o reagente de GRIESS (1% sulfanilamida, 0,1% naftiletilenodiamina e 3% H_3PO_4). As placas foram incubadas ao abrigo da luz. A leitura é realizada a 540 nm em leitor de ELISA.

O limiar de sensibilidade do teste é 1,56 mM, e os resultados foram apresentados como as médias aritméticas das dosagens de culturas em duplicatas $\pm$ desvio padrão (DP).

Para análise comparativa das variáveis quantitativas, foram aplicados o teste de Análise de Variância (ANOVA) e o teste t de Student para significância entre as médias. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 95%. Para as análises, foi utilizado o software SPSS 8.0. (SPSS Brasil, São Paulo, Brasil).

5.3.7. Análise histopatológica

Os órgãos, fígado e intestino, dos animais foram fixados com Carnoy por 45 minutos e em seguida em álcool a 70%. Após a fixação, foram desidratados em uma bateria crescente de álcoois (80° a 100°), diafanizados em xilol e incluídos em parafina. Em seguida, foram realizados os cortes histológicos com espessura de 5 μm . Os cortes foram corados pela técnica de rotina com

Hematoxilina-Eosina (HE) e montados entre lâmina e lamínula com resina sintética (Entellan®) (BANCROFT, ET AL. 1994).

Após a montagem, as preparações foram avaliadas com relação à escolha dos cortes representativos para captura das imagens através de microscópio óptico (LEICA) com câmara digital acoplado a um computador com programa específico para análise de imagem.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em geral, o desenvolvimento de novos agentes terapeuticamente úteis visa três aspectos principais: aumento da atividade biológica; redução dos efeitos colaterais; e promoção de uma eficiente forma de administração do fármaco para o paciente. Os grupos químicos presentes ou introduzidos numa substância são importantes por dois motivos: podem ser essenciais para a manifestação de determinada ação biológica, grupos **farmacofóricos**, em razão de sua reatividade química ou da disposição espacial; e podem modificar a intensidade de determinada ação biológica, em consequência dos efeitos característicos exercidos pelos grupos denominados **biofuncionais** (KOROLKOVAS, 1974).

Relacionando tais conceitos com os compostos em estudos, verificamos a semelhança estrutural das imidazolidinas sintetizadas com o niridazol (Ambilhar®), quimicamente denominado 1-(5-nitro-tiofeno-3-il)-imidazolidin-2-ona. As imidazolidinas apresentam o mesmo grupo farmacofórico do niridazol (Figura 20).

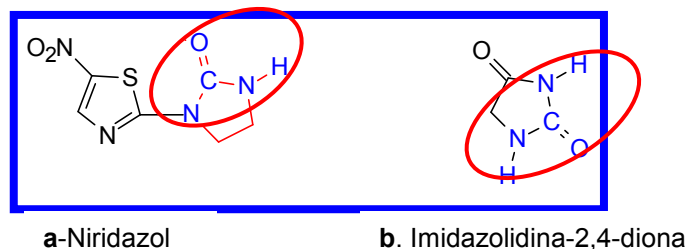


Figura 20: Estruturas químicas do niridazol e da imidazolidina-2,4-diona.

Com relação aos grupos biofuncionais, as moléculas em discussão apresentam as substituições $\text{HC}=\text{C}-\text{N}$ e $\text{C}-\text{N}=\text{N}-\text{C}-\text{N}$ em posição 5 do anel imidazolidínico. Chand e colaboradores (2003) observaram que $\text{C}-\text{N}=\text{N}-\text{C}-\text{N}$ podem atuar como agentes quelantes, uma vez que o nitrogênio da imidazolidina e o nitrogênio do grupamento arilazo atuam como centros doadores. Acreditamos que tal característica possa ser a responsável pela melhor resposta biológica dos derivados 5-arilazo-imidazolidínicos quando comparados aos 5-benzilideno-imidazolidínicos estudados (Figura 21).

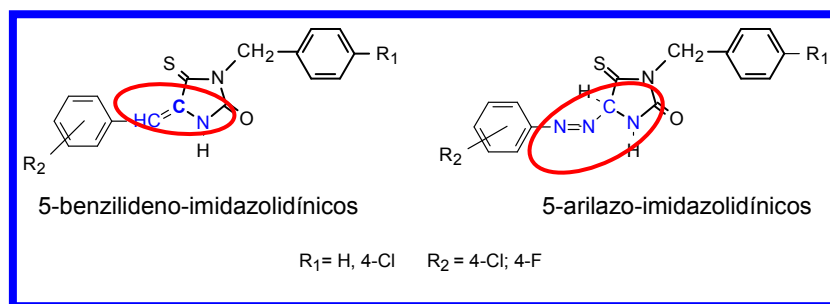


Figura 21: Estruturas químicas dos derivados 5-arylazo-imidazolidínicos quando comparados aos 5-benzilideno-imidazolidínicos.

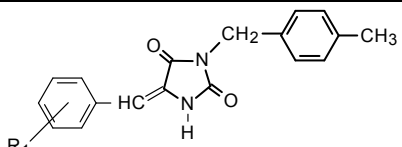
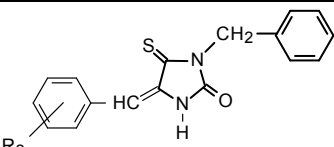
Outras contribuições dos grupos biofuncionais foram dos radicais alquila, átomos de cloro e flúor. O interesse neste tipo de modificação molecular prende-se, portanto, a fatores estéricos e eletrônicos dos halogênios. De fato, os halogênios têm volume atômico substancialmente maior do que o hidrogênio e com exceção da ligação C-F, as ligações C-halogênio são mais fracas do que C-H (SEXTON, 1963 *apud* KOROLKOVAS, 1974). A introdução de radicais alquila podem alterar a basicidade e/ou lipofilicidade de drogas, provocando, então, não apenas modificações nas interações com os sítios receptores, mas também nos fenômenos de absorção e de transporte através dos diversos compartimentos celulares (KOROLKOVAS, 1974).

Tais observações nos permitem relacionar qualitativamente à estrutura química as atividades biológicas observadas.

6.1. Avaliação *in vitro* dos derivados imidazolidínicos frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Cepa BH)

Os derivados imidazolidínicos (LPSF/PT e LPSF/MS) foram inicialmente avaliados *in vitro* frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Cepa BH). Nas concentrações de 80, 160, 320, 640 μM as leituras foram feitas durante cinco dias consecutivos, onde não se constataram uma resposta esquistossomicida satisfatória dos compostos testes (Tabela 03).

Tabela 03 Estrutura química geral dos derivados imidazolidínicos

 LPSF/MS	 LPSF/PT
R ₁ = 4-Cl (MS02)	R ₂ = 4-Cl (PT06)
R ₁ = 4-F (MS05)	R ₂ = 4-F (PT07)
	R ₂ = H (PT08)

Soares (2004) observou que o derivado 3-benzil-5-(4-cloro-arilazo)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT05) apresentou uma maior atividade *in vitro* sobre vermes adultos machos, com 100% de mortalidade após 24 horas de contato quando se utilizou as concentrações de 58, 116 e 174 μM .

O mesmo derivado para os vermes adultos fêmeas levou efeito máximo alcançado com as concentrações de 58 μM e 116 μM com 96 horas e 72 horas respectivamente. Fora observado uma relação direta entre a concentração empregada e o efeito observado no período de 24 horas, havendo, portanto um efeito dependente da concentração (SOARES, 2004).

Para o derivado 5-(4-cloro-arilazo)-3-(4-cloro-benzil)-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT10) foi observado uma taxa de mortalidade de 100 % em 24 horas, dos vermes adultos machos nas concentrações de 158 e 211 μM , enquanto que os vermes adultos fêmeas nas mesmas concentrações apresentaram uma mortalidade em torno de 80% atingindo o efeito máximo com 72 horas de contato (SOARES, 2004).

Com o derivado 5-(4-flúor-arilazo)-3-(4-cloro-benzil)- 4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT11) observamos uma mortalidade de 100% dos vermes adultos macho e fêmea na concentração de 640 μM . Diante destes resultados, foi iniciada a investigação *in vivo* do derivado imidazolidínico LPSF/PT05.

6.2. Avaliação *in vivo* dos derivados imidazolidínicos frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Cepa BH)

Para melhor avaliar a resposta biológica visando melhorar a solubilidade, utilizamos três agentes suspensor. No primeiro caso o agente suspensor usado foi o Tween 80 (monooleato de polioxietileno sorbitan), no segundo caso foi usada uma solução óleo/água a 30% e no terceiro usamos o LPSF/PT05 em dispersão sólida em 90% de PEG. O uso dos agentes suspensor foi devido à dificuldade de solubilização do derivado avaliado. O derivado quando misturado ao Tween 80 não apresentava uma boa solubilização. A emulsão óleo/água a 30 % apresentou uma melhora na solubilização, contudo não de forma satisfatória. O derivado LPSF/PT05 em dispersão sólida em 90 % de PEG, apresentou uma dispersão sem formação de grumos, onde não foi observada formação de grumo.

6.2.1. Redução no número de vermes recuperados

Na avaliação *in vivo* com o derivado LPSF/PT05 nas concentrações de 25, 50, 100 mg/kg, solubilizado em Tween 80 acrescido de solução salina a 9% (veículo). Foi observado uma discreta redução do número de vermes na concentração de 100 mg/Kg, sem que tenha significância estatística.

Quando o derivado imidazolidínico LPSF/PT05 foi solubilizado em Tween/óleo/água, foi observada uma redução no número de vermes, embora não tenha sido proporcional ao aumento da concentração.

O LPSF/PT05 em dispersão sólida em 90% de PEG apresentou uma maior redução no número de vermes, quando comparada aos resultados observados nas suspensões anteriores, conforme a Figura 22:

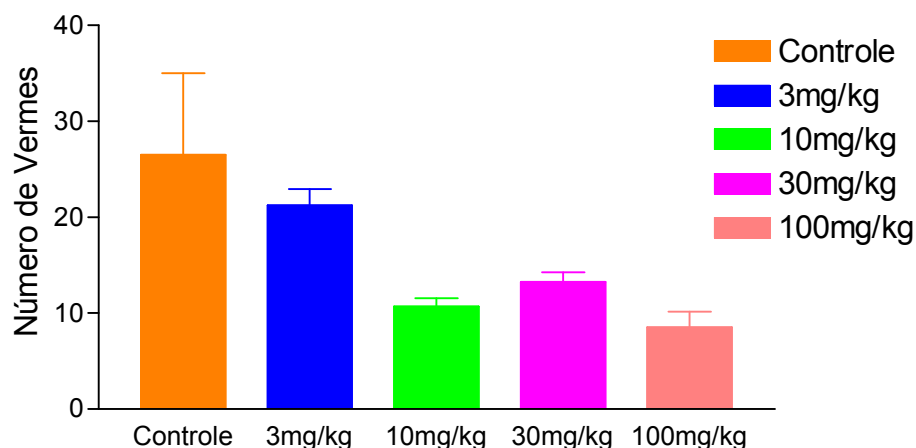


Figura 22: Redução no número de vermes adultos de *S. mansoni* testados em dispersão sólida de LPSF/PT05 em PEG

As percentagens de redução no número de vermes na dose de 3 mg/kg foi de 19,81%, as concentrações de 10 e 30 mg/kg 48,45% e 50%. A maior redução foi observada na concentração de 100 mg/kg que foi de 67,90%. Verificando assim que o aumento na redução do número de vermes foi diretamente proporcional ao aumento da concentração.

Quando o LPSF/PT05 foi solubilizado em tween/óleo/água observamos que a redução no número de vermes não foi proporcional ao aumento da concentração do derivado imidazolidínico, contudo, com a melhora na solubilidade do LPSF/PT05 quando administrado em dispersão sólida de LPSF/PT05 em PEG, os resultados obtidos reforçaram a hipótese do efeito esquistossomicida do LPSF/PT05 observado quando avaliados frente a vermes adultos de *S.mansoni in vitro*.

Segundo a literatura, um composto é considerado eficaz e viável para atividade esquistossomicida quando este oferece uma redução no número de vermes superior a 80% (NWAKA et al., 2006), quando a redução no número de vermes for inferior a 30% considera-se esta uma baixa eficácia (BOTROS et al., 2004). O praziquantel na dose de 200 mg/kg administrada por cinco dias consecutivos, produz uma redução no número de vermes de 94% (BOTROS et al., 2005). O LPSF/PT05 em suspensão sólida em 90% de PEG levou uma redução de 50% nas doses diárias de 10 mg/kg e 30 mg/kg totalizando respectivamente 50 e 150 mg/kg, e na dose diária de 100 mg/kg totalizando 500 mg/kg a redução foi de 68%. O praziquantel, em condições experimentais

similares em nosso laboratório levou a redução do número de vermes de 86,6% na concentração 125 mg/kg, e nas concentrações 500 mg / kg do praziquantel a redução foi de 100%.

O derivado imidazolidínico em questão apresenta uma limitação na sua utilização devido à sua fraca solubilidade na água, sendo este um fator limitante. Baseado nos experimentos realizados, a melhor estratégia usada para superar esse inconveniente foi complexar o LPSF/PT05 em dispersão sólida em 90% de PEG, a qual melhorou a solubilidade refletindo assim na resposta biológica observada.

6.2.2. Resultados do Oograma e do Kato-Katz

Na análise do teste padrão de oograma, que apresenta a percentagem dos estádios de desenvolvimento de ovos de *S. mansoni* em fragmentos intestinais de camundongos infectados, O composto LPSF/PT 05 não induziu nenhuma alteração no oograma, em nenhuma das formulações testadas. Embora se observasse um aumento nos estádios de ovos maduros e inviáveis, quando comparado com o grupo controle não tratado, na concentração de 100 mg/Kg sem significância estatística [$P > 0,05$] (Figura 23). A presença de todas as fases de maturação dos ovos de *S. mansoni* nos fragmentos intestinais pode ser justificada pela carga de vermes adultos residuais os quais não foram eliminados com o tratamento do derivado LPSF/PT05 em dispersão sólida em 90% de PEG mantendo-se o perfil padrão do oograma e a eliminação de ovos nas fezes.

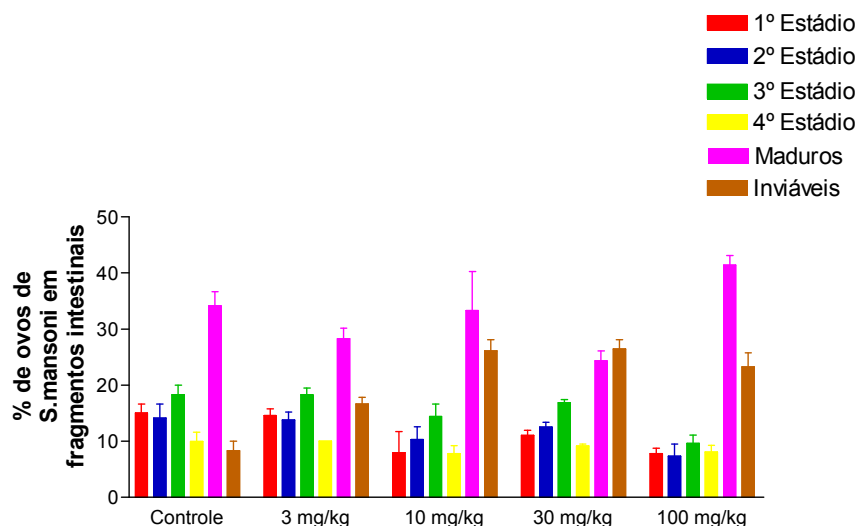


Figura 23: Estádios de ovos de *S. mansoni* em fragmentos intestinais de camundongos infectados

O Método Kato-Katz foi feito em duplicata, nos períodos de pré-tratamento, com oito e com 14 dias contando do último dia de administração. O número de ovos por grama de fezes analisados demonstra claramente a continuidade da oviposição pelos vermes adultos residuais ao tratamento de todas as formulações, contudo o gráfico abaixo se refere ao LPSF/PT05 em suspensão sólida com 90% de PEG (Figura 24).

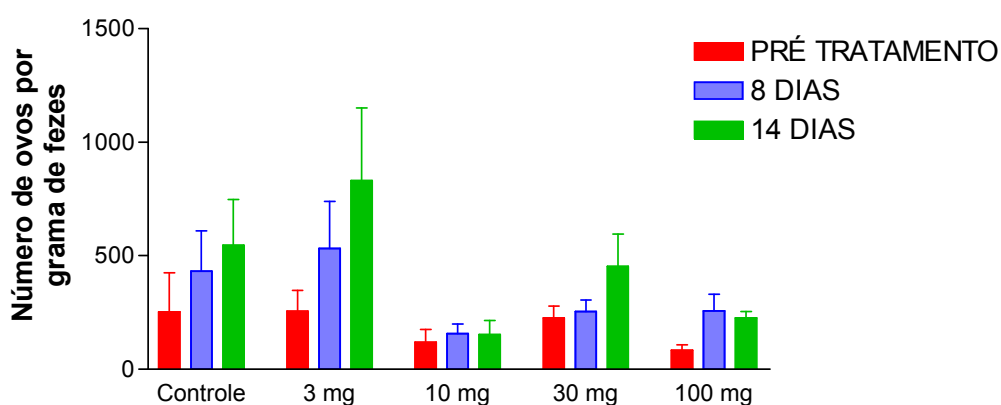


Figura 24: Redução no número de ovos por grama de fezes do LPSF/PT05 em suspensão sólida com 90% de PEG (Método Kato-Katz)

6.3. Efeito do tratamento do derivado LPSF/PT05 e do praziquantel sobre a produção de citocinas e óxido nítrico

O efeito do LPSF/PT05 sobre a produção de citocinas e óxido nítrico não foi realizado nas três formulações. Esta avaliação foi feita apenas nas preparações as quais o LPSF/PT05 levou a uma redução do número de vermes.

Quando o composto avaliado é o praziquantel observam-se diferenças significativas na produção de IL-10, apenas quando as células em cultura foram estimuladas pela Con A, em relação ao controle não tratado (Figura 25). Foi observado também que a dose de 25 mg/Kg corpóreo foi a de maior diferença significativa, com relação ao controle, entre todas as diferentes doses da droga submetidas aos animais.

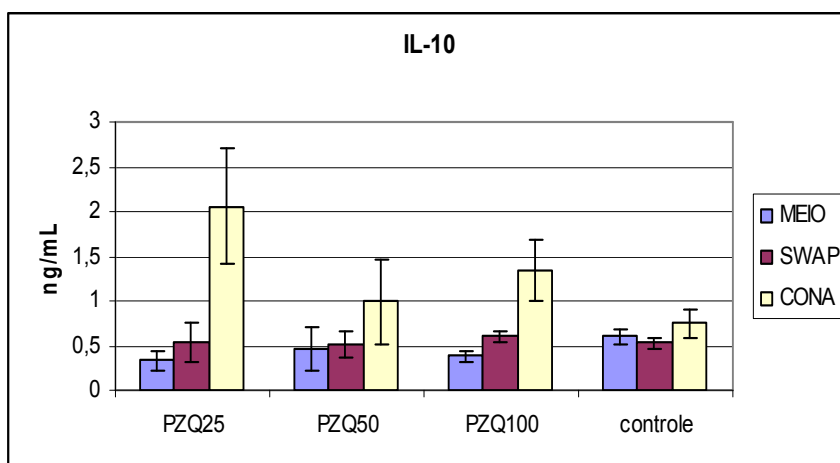


Figura 25: Produção de IL-10 em sobrenadantes das culturas de células em CO₂ a 37 °C dos grupos de camundongos tratados com praziquantel (25, 50 e 100 mg/Kg), e no grupo controle.

A IL-4, por sua vez, apresentou diferenças significativas entre as doses de Praziquantel de 25 mg/Kg e de 100 mg/Kg (Figura 26); a primeira apresentou níveis menores em relação ao controle não-tratado, enquanto que a segunda promoveu a produção de maiores níveis da citocina pelas células, estimuladas pela Con A.

A produção de interferon gama (IFN- γ) foi maior nos animais tratados com o praziquantel, no entanto, observou-se significância estatística apenas nas dosagens de sobrenadantes de células estimuladas com Con A nas culturas de

células dos animais tratados com as doses de 25 mg/Kg (Figura 27) em relação aos animais controles que não receberam tratamento; apenas com o antígeno homólogo SWAP houve diferença significativa em relação ao controle na dose de 25 mg/Kg. Por outro lado, observamos diferenças entre as doses. Doses elevadas de praziquantel inibiram a produção basal de IFN- γ em relação às doses de 25 e 50 mg/Kg.

Quanto à produção do óxido nítrico, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (Figura 28).

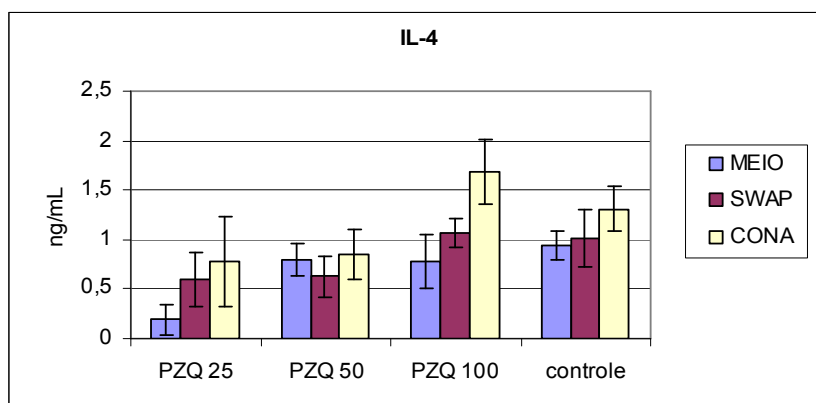


Figura 26: Produção de IL-4 em sobrenadantes das culturas de células em CO₂ a 37 °C dos grupos de camundongos tratados com praziquantel (25, 50 e 100 mg/Kg), e no grupo controle

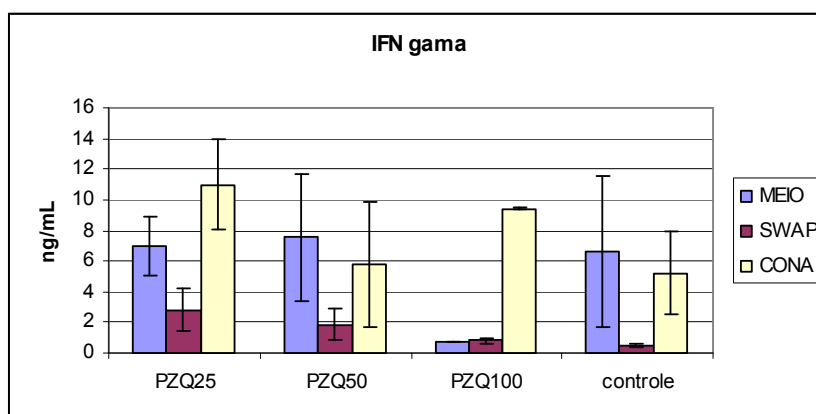


Figura 27: Produção de IFN- γ em sobrenadantes das culturas de células esplênicas de camundongos tratados com praziquantel, (25, 50 e 100 mg/Kg), e no grupo controle.

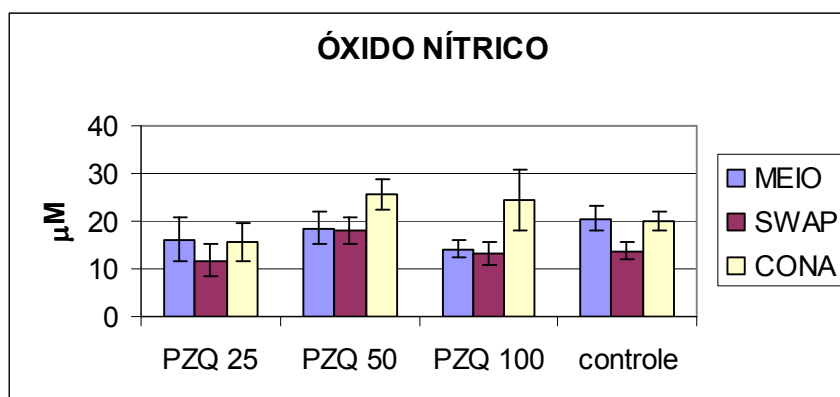


Figura 28: Produção de óxido nítrico em sobrenadantes das culturas de células em CO₂ a 37 °C dos grupos de camundongos tratados com praziquantel (25, 50 e 100 mg/Kg), e no grupo controle.

Um estudo realizado por Joseph e colaboradores (2004) descreveu os efeitos do tratamento com o praziquantel na produção de citocinas por uma população de área endêmica para *S. mansoni*, em resposta aos antígenos SEA (soluble egg antigen), SWAP (soluble worm antigen Purified) e, pela primeira vez, Teg (Tegumento). Foi observado que, após o tratamento, houve aumentos significantes na resposta das citocinas Th2 aos antígenos do verme (SWAP e Teg), e apenas pequenos e não-significantes aumentos nas respostas ao SEA. Os níveis de IL-10 na presença de SEA e SWAP foram aumentados significativamente, fato que sugere que os níveis de IL-4, IL-5 e IL-13 pós-tratamento tornaram-se maiores, mesmo na presença da imunossupressão mediada pela IL-10.

Em camundongos, Singh e colaboradores, em 2004, observaram que o Praziquantel aumenta a sobrevivência dos animais infectados em até 12 meses, apresentando também involução de granulomas. Em relação à produção de citocinas e óxido nítrico, foram observados aumentos nos níveis de IL-5 e IL-4 dentre três e 12 meses de tratamento, mas uma baixa significativa dos níveis de IL-10. Quanto aos níveis de IFN- γ , citocina anti-fibrótica, ocorre um aumento nos seis primeiros meses de tratamento, mas eles decaem após 12 meses. Já a expressão do gene da iNOS no fígado diminuiu significativamente nos camundongos, após três meses de tratamento (SINGH et al., 2004).

O derivado imidazolidínico LPSF/PT5 suspenso na emulsão óleo/Tween/água mostrou um efeito oposto ao observado com os animais tratados com praziquantel. Observamos uma inibição na resposta quanto à produção de IFN γ e IL-4 frente ao antígeno homólogo (SEA) e na estimulação com o mitógeno (ConA) (Figura 29a e 29b), resultados similares foram observados por Pyrrho e colaboradores (2002) usando um antiinflamatório esteroide, dexametasona em camundongos infectados por *S. mansoni* observaram inibição nos níveis de IFN- γ e IL-4.

A produção de NO e IL-10 nos animais tratados com este derivado foram abaixo do limiar de detecção da técnica. Este resultado indica que esta molécula tem um potencial efeito supressor da resposta imune tanto para resposta Th1 quanto para Th2. Por outro lado, é importante avaliar no futuro, o potencial deste derivado como uma molécula antiinflamatória ou imunossupressora.

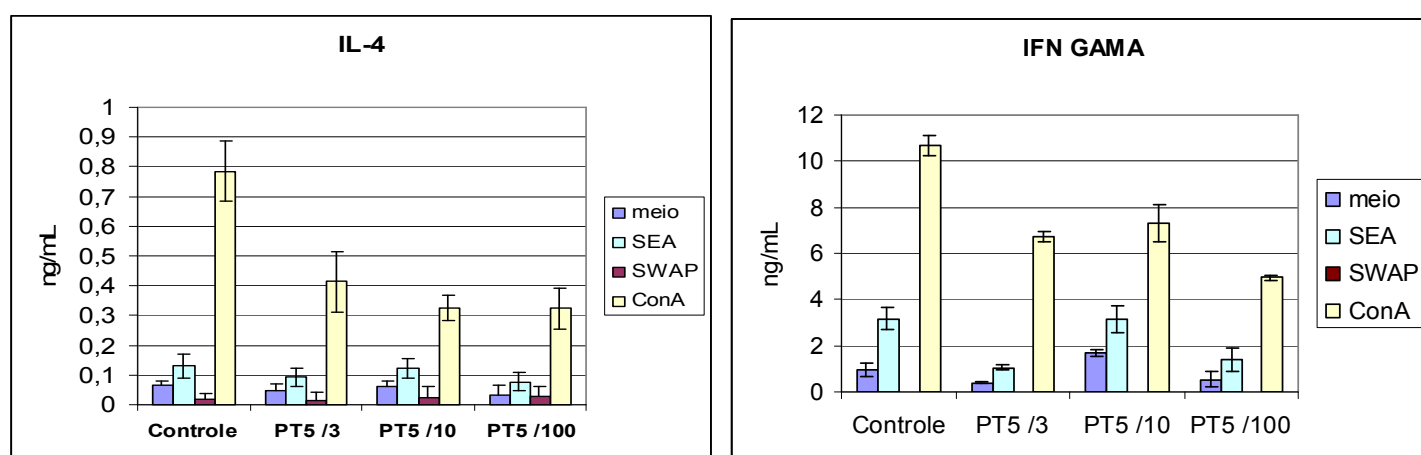


Figura 29: **a**: Produção de IL-4 e **b**: Produção de IFN- γ em sobrenadantes das culturas de células esplênicas de camundongos tratados com LPSF/PT05 (3, 10 e 100 mg/Kg), e no grupo controle não tratado.

As células esplênicas recolhidas a partir de camundongos infectados e tratados com o LPSF/PT05 em dispersão sólida em 90% de PEG, produziram níveis de células muito mais elevados do que os do grupo controle, especialmente para IFN- γ , em animais tratados com 30 mg/kg de peso onde a dose medida foi quatro vezes superior ao controle (Figura 30A).

A produção de IFN- γ estimulada com a ConA foram significativamente reduzidas em camundongos tratados com 10, 30 e 100 mg/kg do LPSF/PT05.

A produção de IL-4 encontrou uma significativa supressão desta citocina com as culturas de células estimuladas pela ConA em animais tratados com a dose de 100 mg/kg de peso. As demais doses não reduziram a produção de IL-4 significativamente (Figura 30b).

Com relação à produção de IL-10 nos animais tratados com este derivado foram abaixo do limiar de detecção da técnica. Com 60 dias de infecção o óxido nítrico não foi afetado nos animais tratados. Tanto os grupos tratados como o controle não apresentou diferenças significativas. No entanto, as culturas de células estimuladas por SEA tiveram uma maior produção de óxido nítrico nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, mas não apresentaram significância estatística (Figura 30c).

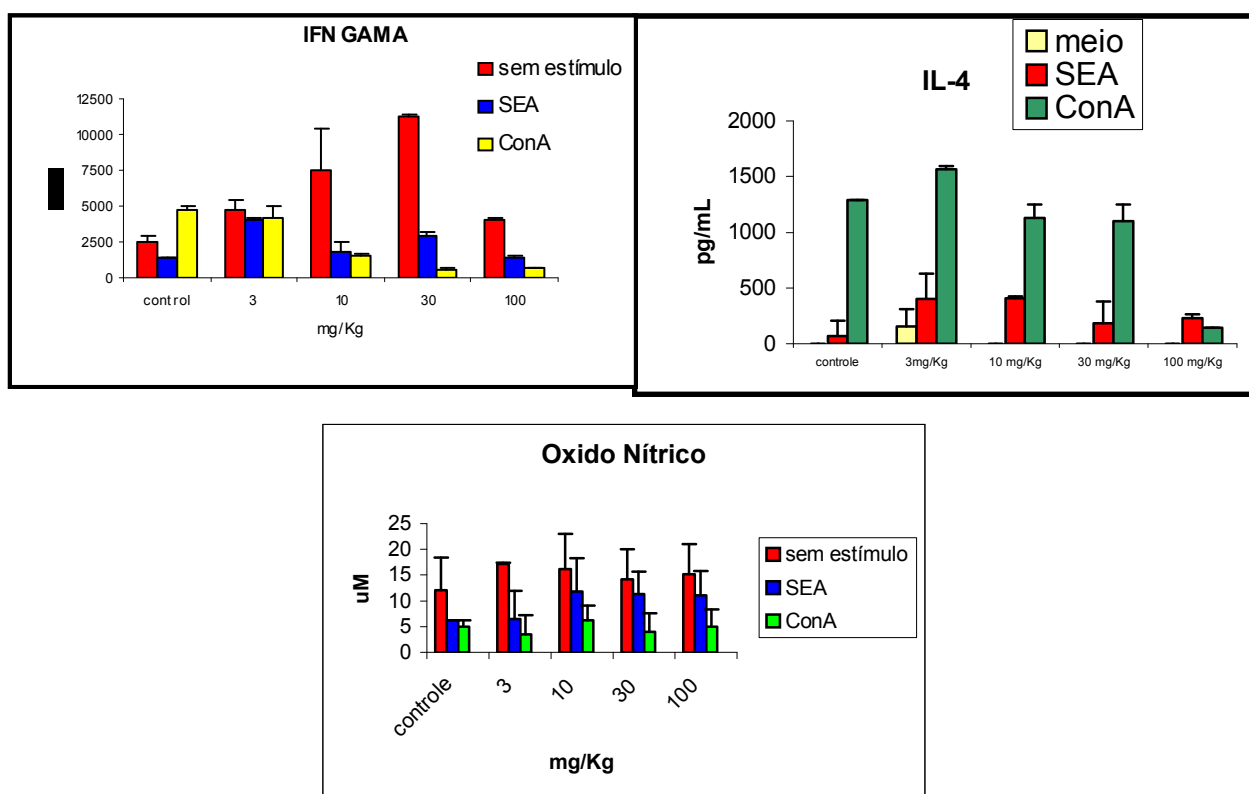


Figura 30. IFN- γ (a) IL4 e (b) produzidos por camundongos infectados com *S. mansoni* tratados ou não tratados com LPSF-PT05. As células de baço foram obtidos a partir de 60 dias camundongos infectados (tratado ou não) e cultivadas a 72h antes da colheita dos sobrenadantes a determinação de citocinas por ELISA e de produção nitrito. (c) produção de óxido nítrico detectadas por nitrito determinar a acumulação método Griess. Médias Aritméticas + SD experimentos em duplicata: * inferior ao controle p <0,05. ** Mais elevado do que o controle p <0,05.

A resposta imune na infecção de *S. mansoni* é um mecanismo dependente de células T, onde inicialmente há uma resposta Th1 nas fases

iniciais do parasito (LUKACS e BOROS, 1992). Após a deposição dos ovos há um aumento na resposta Th2 com a produção de IL-4 e IL-5 (GRZYCH et al., 1991). E este saldo entre as citocinas Th1 e Th2 são fatores determinantes na regulação da patologia e a formação do granuloma e da fibrose hepática. Somado a este fenômeno há também uma resposta imune-celular inflamatória responsável pelo resultado da fibrose periportal (PHILLIPS e LAMMIE, 1986; LUKACS et al., 1994).

Quando analisamos o efeito do tratamento do LPSF/PT05 em dispersão sólida em 90% de PEG sobre a produção de citocinas em resposta a SEA, ConA e células de camundongos infectados e não tratados (controle), não foi encontrada diferenças significativa na produção de IL-4, IL10, IFN- γ em resposta ao antígeno específico SEA. Contudo, observou-se uma supressão no IFN- γ dose dependente para as doses de 10, 30 e 100 mg/Kg das células estimuladas pelo agente mitógeno ConA (ConcavalinaA), reforçando a hipótese de uma resposta imunossupressora deste derivado, sugerindo um possível efeito supressor sobre a resposta linfocitária. Sabourin e colaboradores (2004) demonstrou que uma imidazolidin-2-ona N1-mono e N1, N2-dissubstituídos apresentava uma significativa resposta imunossupressora similar a resposta observada com a ciclosporina A inibindo fortemente a proliferação de esplenócitos estimulados com ConA. São necessárias futuras investigações do potencial imunossupressor do derivado imidazolidínico testado, contudo, é possível que a supressão do IFN- γ esteja ligada a supressão das células T.

Surpreendentemente, a produção basal de IFN- γ dos animais tratados foi fortemente estimulada e este estímulo foi dose dependente. Acredita-se que esta resposta seja devido a um mecanismo de resposta imune que fora ativado, e esta produção tenha sido independente da ativação das células T. no futuro é preciso uma investigação se este IFN- γ é produzido pelas células apresentadoras de antígenos (APC) e ou as células NK ativadas pelo derivado LPSF/PT05 em dispersão sólida em 90% de PEG.

As células estimuladoras de mitógenos com dose máxima de 100 mg/kg suprimiram a produção de IL-4. Em altas doses se encontrou uma baixa estimulação basal na produção de IFN- γ e também uma inibição nos mitógenos

estimulados pelo IFN- γ . O efeito do derivado na resposta Th1 e Th2 podem ser responsável pelo melhor resultado no tratamento.

6.4. Avaliação histopatológica do derivado imidazolidínico LPSF/PT05

No homem a cinética de formação do granuloma é avaliada através de biópsias das lesões hepáticas da forma toxêmica (fase aguda) da esquistossomose mansônica (BARROS-COELHO; 1955; RASO & BOGLIOLO, 1970; RASO, et al., 1978). Esses autores mostraram que, em sua evolução, os granulomas esquistossomóticos apresentavam as fases necrótico-exudativa, exudativas, produtivas e, finalmente, cura por fibrose.

Para as três preparações do LPSF/PT05 se observou uma modulação na reação granulomatosa no fígado. Na preparação do LPSF/PT05 em Tween 80 e solução salina se observaram uma modulação na resposta granulomatosa no fígado para a dose de 100 mg/kg (Figura 31G), quando comparado ao grupo controle (Figura 31A).

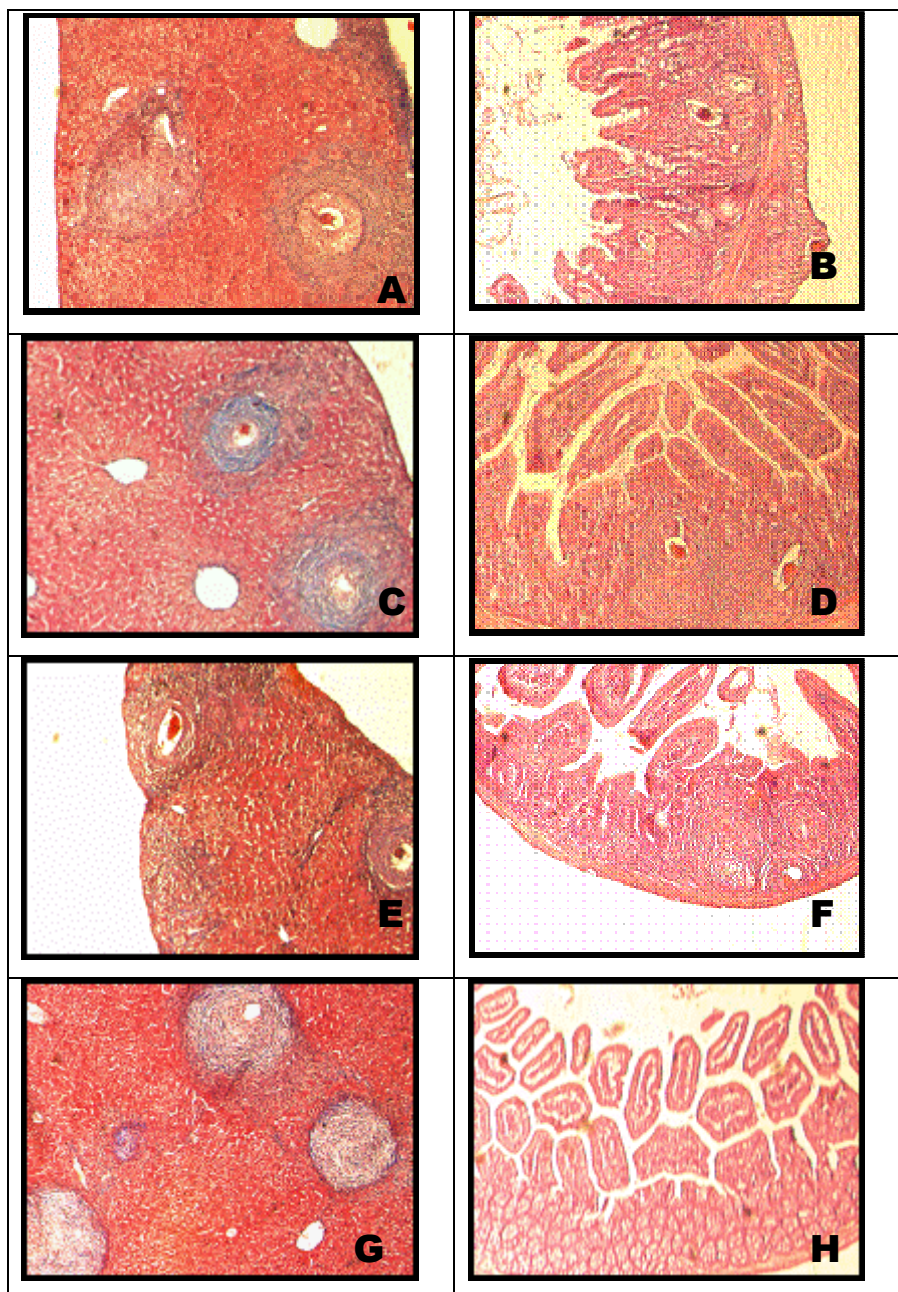


Figura 31: Fotomicrografias de estágio de granulomas no fígado (A, C, E e G) e no intestino (B, D, F e H) de camundongos infectados com *S. mansoni* e tratados com o LPSF/PT05 em preparação com salina e tween 80. A e B) controle infectado, observa-se granulomas na fase exudativo-produto tanto no fígado (A) como no intestino (B), C e D) grupo tratado com dose de 25 mg/kg, E e F) grupo tratado com dose de 50 mg/kg e G e H) grupo tratado com dose de 100 mg/kg. Observa-se que existe granulomas na fase exudativo-produto exceto para a dose de 100 mg/kg. H & E. As fotomicrografias estão em ampliação de 100 X.

Na patogenia da esquistossomose mansônica o principal fenômeno que ocorre é a fibrose hepática, uma consequência do estabelecimento dos granulomas. No intestino, delgado e grosso, também ocorrem granulomas, mas exceção feita a alguns casos raros, não se detecta uma fibrose expressiva. A reabsorção da fibrose tanto no fígado, quanto no intestino, não demonstra

nenhuma diferença na velocidade de reabsorção da fibrose nestes dois órgãos. Os dados são compatíveis com a hipótese de que há uma maior produção de colágeno no fígado do que no intestino, quando estes dois órgãos são submetidos ao estímulo antigênico do ovo do *S. mansoni* (SANTOS, 1990).

As células satélites (HSCs) é a chave para a fibrose hepática. Elas são os principais tipos de células no pulmão a produzir fibrina de colágeno. Portanto, é considerado o alvo na prevenção de fibrose (ZOU, 2007). Bartley e colaboradores (2006) enfatizam a ação das células satélites hepáticas (HSCs) no processo de fibrose granulomatosa induzida por ovos de *Schistosoma mansoni* e a importância dessas células como moduladores na progressão da doença. A ação moduladora do LPSF/PT05 (100 mg/Kg) sobre a reação granulomatosa no tecido hepático pode estar relacionada à inibição da ativação dessas células satélites.

Nas avaliações histopatológica realizadas a partir de amostras de fígados e intestinos dos camundongos infectados e tratados com o LPSF/PT05 suspenso em Tween/óleo/água demonstra que a dose de 100 mg/kg foi capaz de modular a reação granulomatosa no fígado quando comparado ao controle infectado (Figura 32A) e com as doses de 3 (Figura 32C) e 10 mg/Kg (Figura 32E); uma vez que, observamos ausência de ovos e fibrose circunscrita ao local da reação. Quando a amostra foi corada com tricômico, para podermos avaliar a deposição do colágeno, podemos observar um aumento deste. Com relação a mucosa intestinal, controle (Figura 32B) e nas doses de 3 mg/kg (Figura 32D) e 10 mg/kg (Figura 32F) observa-se ainda a presença de granulomas ativados localizados na lâmina própria da mucosa e serosa, enquanto que nas doses de 100mg/kg de peso (Figura 32H) observamos a mucosa intestinal preservada, sem a presença de granulomas ativados.

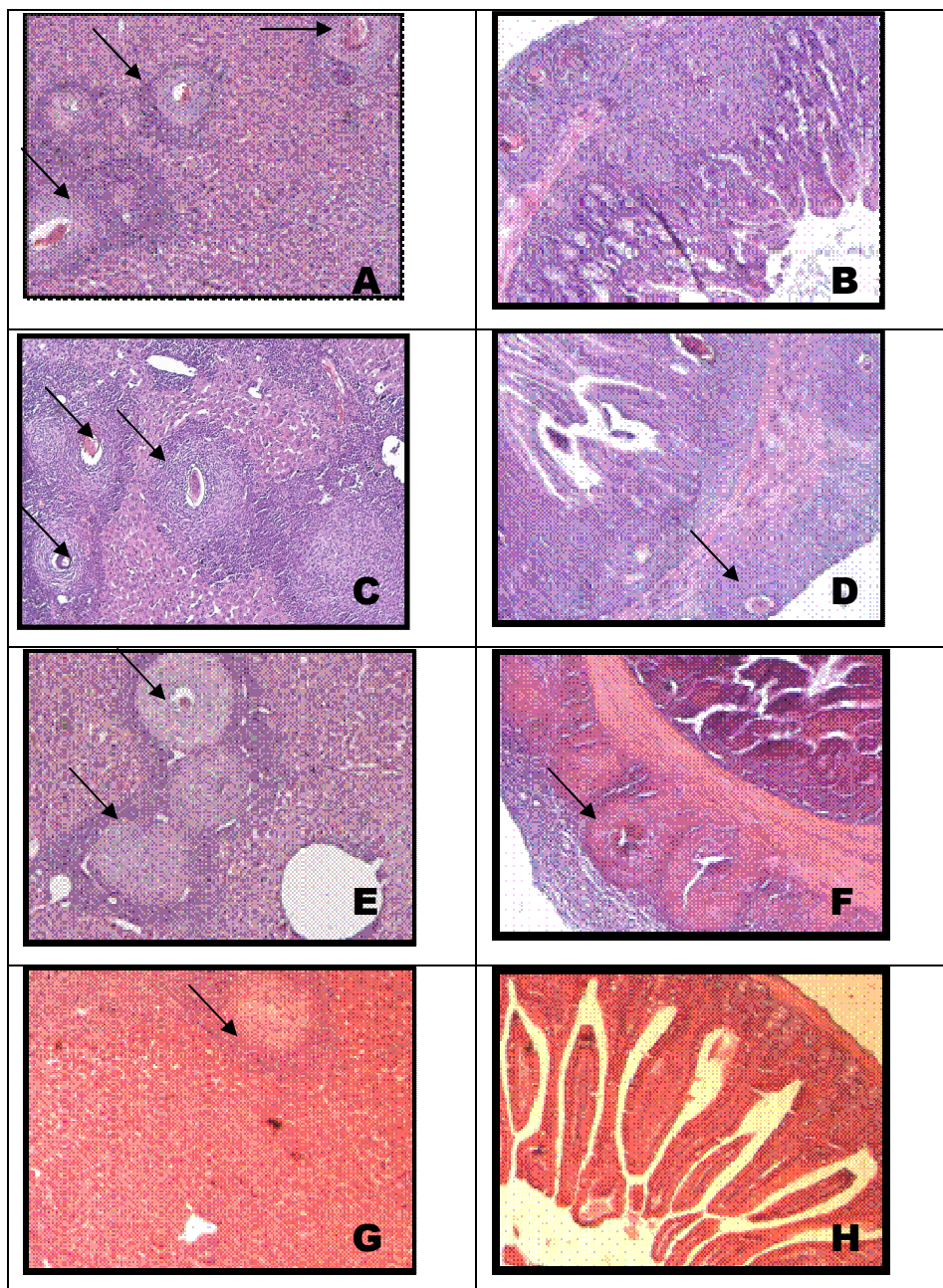


Figura 32: Fotomicrografias de estágios de granulomas em fígados e intestinos (respectivamente) de camundongos infectados por *S. mansoni*. A e B) controle infectado, exibindo granuloma em fase exudativa-produtiva (setas). C e D) fígado e intestino, respectivamente, de camundongos infectados e tratados com o LPSF/PT05 em emulsão tween/óleo/água na dose de 3 mg/kg por dia. Apresentando granulomas na fase exudativa-produtiva tanto para o fígado como para o intestino. E e F) (10 mg/kg por dia) no fígado (E) observa-se granulomas em fase de resolução e na fase exudativa-produtiva (F) granuloma em fase de resolução na mucosa intestinal. G e H) (100 mg/kg por dia) observa-se poucos granulomas em fase de resolução (G) e ausência de granulomas no intestino. H & E. as fotomicrografias estão em ampliação de 100 X.

Mantendo o mesmo padrão das análises anteriores, pode-se observar que na análise histopatológica o tratamento de camundongos infectados com LPSF/PT05 em dispersão sólida em 90% de PEG nas doses de 10, 30 ou 100

mg/kg por dia produziram uma ação eficaz contra os danos hepáticos, causada pela infecção de *S. mansoni*, como foi demonstrado pela redução do número de vermes recuperados, especialmente quando analisados no fígado uma modulação granulomatosa (Figura 33). Na figura 33 (A e B) controle infectado, exibindo fase granulomatosa exsudativos-produtivos com uma maturidade, observando ovos viáveis no centro da granulomas fibrocelular (fígado) e presença de ovos viáveis detectados em camadas serosas e submucosa do intestino. Quando se observa a figura 33 (C, D) tratados com LPSF/PT05 (3 mg/kg por dia), mostra bem pequenos granulomas fibrocelular circunscritos e com ovos em degeneração no fígado e granulomas nas fase produtivo e em resolução em camadas submucosa (intestino). Na dose de LPSF/PT05 (10 mg/kg por dia (Figura 33: E e F), verifica-se no fígado granulomas na fase produtiva e em resolução e no intestino foi detectados ovos viáveis na submucosa. Na figura 33 (G e H) LPSF/PT05 (30 mg/kg por dia), observou granulomas em fase de resolução no fígado e ovos viáveis detectados em camadas submucosa e muscular do intestino. Na concentração de LPFS/PT05 (100 mg/kg por dia) (Figura 33: I e J) nota-se granulomas em fase de resolução no fígado e no intestino detecta-se ovos viáveis apenas em camadas submucosa.

Do ponto da patologia geral periovular dos granulomas esquistossomótico são dinamicamente semelhantes à cicatrização, com produção de tecido de granulação, que se torna menos vascularizada com o tempo, enquanto que o tecido fibroso cicatricial se torna mais maduro e compacto. Na tabela 5 observou-se uma diminuição das fases exsudativos-produtivos para todas as concentrações, com bastante significativa para as 10 e 100 mg/kg e não se observou resposta semelhante com as fases em resolução. A média do número de granulomas do intestino (Tabela 6) para as fases exsudativos-produtivos não mostrou diferença quando comparado com o controle. Os camundongos tratados com 3 mg/kg (LPSF/PT05-PEG) demonstram um aumento significativo do número de granuloma em fase de resolução.

Tabela 4

Media do número de granulomas hepáticos de animais infectados e tratados com LPSF/PT05-PEG

Estágios dos granulomas	Número de granulomas hepáticos de camundongos infectados e tratados com LPSF/PT05-PEG				
	controle	3mg/Kg	10mg/Kg	30mg/Kg	100mg/Kg
Exudativo- produtivo	22.33 ± 4.16*	15.66 ± 8.50	8.00 ± 1.70* [#]	20.66 ± 5.80 [#] •	11.00 ± 1.00*•
Em resolução	32.33 ± 12.50	43.33 ± 16.20	20.66 ± 7.76 [♦]	44.00 ± 11.35 [♦]	29.66 ± 9.29

Animais por grupo (n=3). Os valores são expressos em média ± SD. Comparações são feitas por Student's *t*-test e os valores são representados por média ± SEM ($p \leq 0.05$)

Tabela 5

Media do número de granulomas intestinais de animais infectados e tratados com LPSF/PT05-PEG

Estágios dos granulomas	Número de granulomas intestinais de camundongos infectados e tratados com LPSF/PT05-PEG				
	control	3mg/Kg	10mg/Kg	30mg/Kg	100mg/Kg
Exudativo- produtivo	3.75 ± 2.50	3.75 ± 2.98	2.00 ± 1.15	4.25 ± 3.30	2.50 ± 1.91
resolução	1.50 ± 1.00 [#]	4.25 ± 1.50 ^{#*}	2.50 ± 3.00	2.00 ± 2.44	0.75 ± 0.95*

Animais por grupo (n=4). Os valores são expressos em média ± SD. Comparações são feitas por Student's *t*-test e os valores são representados por média ± SEM ($p \leq 0.05$).

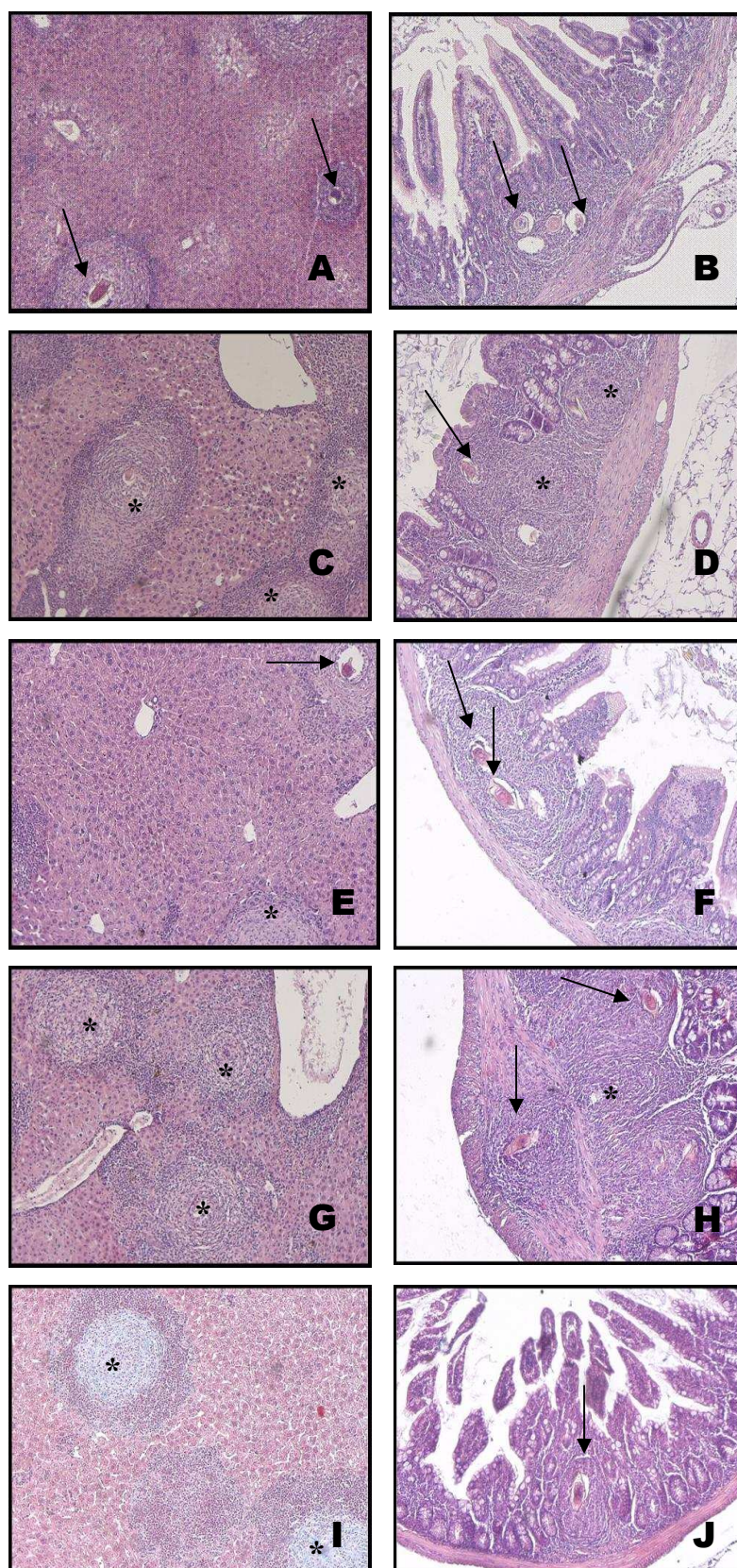


Figura 33. Fotomicrografias de estágios de granulomas em fígados e intestinos (respectivamente) de camundongos infectados por *S. mansoni*. A e B Controle infectado; C, D) LPSF/PT05 (3 mg/kg por dia); E e F) LPSF/PT05 (10 mg/kg); G e H) LPSF/PT05 (30 mg/kg); I e J) LPSF/PT05 (100 mg/kg por dia), . H & E e Masson 'Tricomico, as fotomicrografias estão em ampliação de 100x.

As análises histopatológicas dos animais tratados com o LPSF/PT05 em dispersão sólida em 90% de PEG são consistentes com as observações encontradas nos estudos da avaliação imunológica. A atividade imunossupressora sugerida nos estudos imunológicos foi reforçada com o aspecto morfológico do parênquima hepático dos animais infectados e tratados com o derivado imidazolidínico, e para a dose de 100 mg/kg se observou granulomas em fase de resolução com áreas de injúrias do tecido limitada. Contudo nas doses mais baixas (3, 10 e 30 mg/kg) estes efeitos foram observados em menores proporções.

A redução dos granulomas hepáticos no estágio exudativo-produtivo foi observado para todas as doses, principalmente na dose de 100 mg/kg e isto pode estar relacionado com a baixa produção de IL-4 e consequentemente com a diminuição na resposta TH2. Segundo Cheever e colaboradores (1995) e Chensue e colaboradores (1992) camundongos infectados com *S. mansoni* e *S. japonicum* tratados com anti-IL-4, apresentou uma diminuição na formação da fibrose e redução na formação do granuloma (CHEEVER et al., 1995; CHENSUE et al., 1992).

Intrigantemente, as análises histológicas dos intestinos examinados revelaram que os animais tratados com a dose de 3 mg/kg demonstraram um significativo aumento no número de granulomas em resolução, quando comparado com o parênquima hepático, provavelmente associado com as possíveis variações biológicas do animal, sendo esta hormonal, imunológica entre outras.

Estes resultados (parasitológico, imunológico e histopatológico) apontam o derivado imidazolidínico LPSF/PT05 como um candidato em potencial para o tratamento da esquistossomose. Para a dose de 100 mg/kg encontrou-se efeitos na redução no número de vermes e uma maior modulação na formação dos granulomas. O derivado imidazolidínico pode ter um papel nos granulomas em resolução, possivelmente via supressão da atividade imunológica.



CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS

7.0. CONCLUSÕES

A busca por novas moléculas que apresentem atividade esquistossomicida foi a mola propulsora para este trabalho. Diante deste propósito concluiu-se que:

- Nas condições experimentais os derivados imidazolidínicos das séries 5-benzilideno-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT), e 5-benzilideno-3-(4-metil-benzil)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/MS) não provocaram efeitos consideráveis sobre a mortalidade, pareamento, atividade motora e integridade do tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* mantidos *in vitro*.
- A hipótese da influência das substituições HC=C-N e C-N=N-C-N em posição 5 do anel imidazolidínico na atividade biológica por atuarem como centro doadores de elétrons, é reforçada com a excelente atividade *in vitro* frente os vermes adultos de *S. mansoni* dos derivados da série 5-arilazo-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-ona (LPSF/PT) apresentando mortalidade de 100% nas primeiras 24 horas nas concentrações que variaram de 58 a 640 μ M.
- Das três formulações usadas nos experimentos *in vivo*, a dispersão sólida de LPSF/PT05 em PEG apresentou o melhor resultado com redução no número de vermes recuperados de 50% para as doses de 10 e 30 mg/kg e de 68% para a dose de 100 mg/kg. Sugere-se que seja devido a uma melhora na solubilidade do derivado em questão, melhorando assim sua absorção.
- O efeito do derivado LPSF/PT05 na produção de citocinas e óxido nítrico, levanta indícios de um potencial efeito supressor da resposta imune.
- A avaliação histopatológica do derivado LPSF/PT05 revelou uma melhor resposta com granulomas em fase de resolução, na dose de

100 mg/kg das três preparações testadas, contudo é necessário realizar uma análise histopatológica mais detalhada.

7.1. PERSPECTIVA

O potencial esquistossomicida do derivado LPSF/PT05 avaliado *in vitro* e *in vivo* levanta grandes perspectivas de complementação e aprofundamento deste estudo:

A avaliação do efeito do LPSF/PT05 frentes aos vermes jovens;

O potencial antioxidante do derivado bem como as enzimas envolvidas no estresse oxidativo do fígado.

A avaliação da atividade antiinflamatória e imunossupressora do LPSF/PT05;

Avaliação *in vivo* dos derivados LPSF/PT10 e LPSF/PT11 em dispersão sólida em 90% de PEG, frente os vermes adultos e jovens de *S. mansoni*, como também o potencial antioxidante e a atividade antiinflamatória e imunossupressora.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA



8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M.C.P.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 thioxo-imidazolidine compounds. **Pharmazie**, 60, 13-17, 2005.

AMIRI, P. et al., Tumor necrosis factor α restores granulomas and induces parasite eggs laying in schistosome infected SCID mice. **Nature**, 356, 604-606, 1992.

ANDREWS P.; THOMAS, H.; POHLKE, R.; SEUBERT, J. Praziquantel, **Med. Res. Rev.** 3, 147-200. 1983.

ARAÚJO, N.P., SOUZA, C.P., PASSOS, L.D.J., SIMPSON, A.J.G., DIAS-NETO, E., PEREIRA, T.R., CERUTI, J.R.C., ALENCAR, F.E.C., DIETZ, R., KATZ, N. Susceptibilidade dos agentes quimioterápicos de isolados de *S.mansoni* oriundos de pacientes tratados com oxamniquina e praziquantel e não curados. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 29, 467-476, 1996.

BADR, S. G. E; PICA-MATTOCCIA, L.; MORONI, R.; ANGÉLICO, M.; CIOLI, D. Effect of bile salts on oviposition *in vitro* by *Schistosoma mansoni* **Parasitology Res.** 85, 421-423, 1999.

BALDE, A.M., VAN MARCK, E.A., KESTERNS, L., GIGASE, P.L., VLIETINCK, A.J. Schistosomicidal effect of *Pavetta owariensis* and *Harrisonia abyssinica* in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Planta Med.** 55, 41-43, 1989.

BANCROFT, J.D., COOK, H.C.: Manual of Histological Techniques and Their Diagnostic Application. Livingstone, Churchill, p.p. 23, 40, 146-147, 1994.

BARBOSA, C.S.; SILVA, C.B.; BARBOSA, F. S. Esquistossomose: reprodução e expansão da endemia no Estado de Pernambuco, Brasil. **Revista de saúde Pública**, 30 (06) 609-616.1996.

BARBOSA CS, MONTENEGRO SML, ABATH FG, DOMINGUES ALC. Specific situations related to acute schistosomiasis in Pernambuco, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, 96: 169-172. 2001.

BARREIRO, E.J. FRAGA, C.A.M. Química Medicinal as Bases Moleculares da Ação dos Fármacos. Ed.Artimed,Porto alegre, 2001.

BARROS-COELHO, R. Patologia da Esquistossomose mansônica. 1. Comportamento do ovo de *Schistosoma mansoni*. **Publ. Avulsas Inst. Aggeu Magalhães**, 4: 61, 1955.

BARTH, L.R.; FERNANDES, A.P.M.; RIBEIRO-PAES, J.T.; RODRIGUES, V. Effects of goyazensolide during *in vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 92, 3, 427-429, 1996.

BARTLEY PB, RAMM GA, JONES MK, RUDELL RG, LI Y, MCMANUS D. P. A contributory role for activated hepatic stellate cells in the dynamics of *Schistosoma japonicum* egg-induced fibrosis. **Int J Parasitol.** 36(9):993-1001. 2006.

BASCH P.F., CLEMENS, L.E. *Schistosoma mansoni*: reversible destruction of testes by procarbazine. **Comp. Biochem. Physiol. C.** 93, 397-401, 1989.

BATEMAN, J.H. Hydantoin and derivatives. *In*: GRAYSON; MARTIN; ECKROTH, **Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology**, New York: Wiley, 1980, 12, 692-711.

BENAZET, F.; LEROY, J.P. Activité de la (nitro-5 thiazolyl-2)-I imidazolidine thione-2 (26354 R.P.) sur la bilharziose expérimentale des animaux de laboratoire. **Bull. Soc. Pat. E.**, n. 3, p. 287-297, 1974.

BERGQUIST, N.R., Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 93, 95–101. 1998

BERGQUIST, R, AL-SHERBINY, M, BARAKAT, R, OLDS, R Blueprint for schistosomiasis vaccine development. **Acta Trop** 82:183–192. 2002

BERGQUIST, N.R. Schistosomiasis: from risk assessment to control. **Trends Parasitol.** 18, 309-314, 2002.

BERGQUIST, N.R., LEONARDO, L.R., MITCHELL, G.F., Vaccine-linked chemotherapy: can schistosomiasis control benefit from an integrated approach? **Trends Parasitol.** 21, 112-117, 2005.

BLANCHARD, T.J. Schistosomiasis. **Travel Medicine and Infectious Disease** 2, 5–11, 2004.

BONESSO-SABADINI, P.I.P., DIAS, L.C.S. Altered response of *Schistosoma mansoni* to oxamniquine and praziquantel. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 97, 381-385, 2002.

BONN, D. Schistosomiasis: a new target for calcium-channel blockers? **Lancet Infect Dis.** 4, 190, 2004.

BOROS, D.L., PELLE, R.P., WARREN, Spontaneous modulation of granulomatous hypersensitivity in schistosomiasis mansoni, **J.Immunol.** 114(5): 1437-1441, 1995.

BOTROS, S., SAYED, H., AMER, N., EL-GHANNAM, M., BENNETT, J.L., DAY, T.A. Current status of sensibility to praziquantel in a focus of potencial drug

resistance in Egypt. **International Journal for Parasitology** , 35, 787-791, 2005.

BOTROS, S., WILLIAM, S., EBEID, F., CIOLI, D., KATZ, N., DAY, T.A., BENNET, J.L. Lack of evidence for an antischistosomal activity of myrrh in experimental animals. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 71, (02), 206-210, 2004.

BRASIL, Ministério da Saúde **DECIT**. Prioridades de Pesquisa em Saúde. 2006. Cad. II Doenças Negligenciadas. 2006. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/Pesquisa_Saude/tela4_2.html, acessado em 27/08/2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Programa de Controle da Esquistossomose**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/.cfm?idtxt=22072>. Acessado em 16/Dez/2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 816 p. 2005.

BREDLEY, P.J. Drug resistance to schistosomicides and other anthelmintics of medical significance. **Acta tropica**, 56, 213-31.1994.

BROOKER S, UTZINGER J. Integrated disease mapping in a polyparasitic world. **Geospatial Health**; 1:141–146. 2007.

BRUNET, L.R., DUNNE, D.W., PEARCE, E.J. Cytokine interaction and immune responses during *Schistosoma mansoni* infection. **Parasitology Today**, 14, 10, 1998.

BRUNET, L.R., BEALL, M., DUNNE, D.W., PEARCE, E.J. Nitric Oxide and the Th2 response combine to prevent severe hepatic damage during *Schistosoma mansoni* infection. **The Journal of Immunology**, 163: 4976-4984. 1999.

BUEDING, E., BALTZINGER, R., PETTERSON, G. Antischistosomal and some toxicological properties of a nitrodiphenyl amino isothiocyanate (C 9333-GO/CGP 4540) **Experimentia** 32, 604-606, 1976

CAFFREY, C.R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Current Opinion in Chemical Biology**, 11:1–7, 2007.

CAPRON, A, RIVEAU, G, CAPRON, M, TROTTEIN, F Schistosomes: the road from host–parasite interactions to vaccines in clinical trials. **Trends Parasitol** 21:143–149. 2005

CAPRON, A., RIVEAU G., BARTLEY, P., McMANUS, D.P. Prospects for a schistosome vaccine. Curr. Drug Targets Immune **Endocr Metab Disord.** 2, 281-290, 2002.

CARVALHO E.M.F., ACIOLI M.D., BRANCO M.A.F., COSTA A.M., CESSE E.A.P., ANDRADE A.G., MELLO E.M.L.L. Evolução da esquistossomose na Zona da Mata Sul de Pernambuco. Epidemiologia e situação atual: controle ou descontrole? **Cad Saúde Pública** 14: 787-795, 1998.

CARVALHO, M.S. **Novas moléculas imidazolidínicas: Preparação, determinação estrutural e avaliação da atividade anticonvulsivante**. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. Brasil, 2005.

CATTO, B.A.; TRACY, J.W.; WEBSTER, L.T. 1-Thiocarbamyl-2-imidazolidinone, a metabolite of niridazole in *S. mansoni*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, 10, 111-120, 1984.

CHAND B.G., RAY U.S., MOSTAFA G, CHENG J., LU T.-H, SINHA C. Difference in bonding behaviour of azide and thiocyanate to Hg(II)-azoimidazoles. **Inorganica Chimica Acta** 358, 1927–1933, 2005.

CHEEVER A.W., FINKELMAN F.D., COX T.M., Anti-interleukin-4 treatment diminishes secretion of Th2 cytokines and inhibits hepatic fibrosis in murine schistosomiasis Japonica, **Parasite Immunol.** 17:103–109. 1995.

Cherfas J New hope for vaccine against schistosomiasis. **Science** 251:630–63. 1991

CHENSUE S.W., TEREBUH P.D., WARMINGTON K.S., HERSHEY S.D., EVANOFF H.L., KUNKEL S.L., HIGASHI G.I., Role of IL-4 and IFN-gamma in *Schistosoma mansoni* egg induced hypersensitivity granuloma formation. Orchestration, relative contribution, and relationship to macrophage function, **J. Immunol.** 148:900–906. 1992.

CHEN, G.Z., FOSTER, L., BENNETT, J.L. Antischistosomal action of mevinolin: evidence that 3-hydroxy-methylglytaryl-coenzyme A reductase activity in *Schistosoma mansoni* is vital for parasite survival. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.** 342, 477-482, 1990.

CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Tropica**, 77: 41 – 51, 2000.

CIOLO, D., Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? **Current Opinion in Infectious Diseases**, 13, 659-663, 2000.

CIOLO, D., PICA, M.L., ARCHER, S. Drugs resistance in schistosomes. **Parasitol. Today** 9, 162–166. 1993

CIOLO, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal Drugs: Past, present...and future? **Pharmacology & Therapeutics**, 68, 01, 35-85.1995.

COELHO, P.M.Z., LIMA, F.C.S., NOGUEIRA, J.A.M. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* strain isolate from a patient submitted to repeated treatments. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 39, 101–106. 1997.

COLLON, C.P. Schistosomiasis. **Medicine**, 33, 8, 64-67, 2005.

CORREA-OLIVEIRA, R ; CALDAS, RODRIGUES, I. ; MARTINS FILHO, ASSIS, O., CARVALHO-QUEIROZ, C., LAMBERTUCCI, J. R., CUNHA-MELO, J. R., SILVEIRA, SOARES, A.M., PRATA, A., WILSON, A. R., GAZZINELLI, G. Analysis of the effects of treatment of human *Schistosoma mansoni* infection on the immune response of patients from endemic areas. **Acta Tropica**, 77, 141-146, 2000.

COURA, J.R, AMARAL, R.S. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 99 (supl.1): 13-19, 2004.

CUNHA, A.S. **Esquistossomose Mansonii**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 1970.

DAVIS, A.; WEGNER, D. H. G. Multicentre trials of praziquantel in human schistosomiasis: design and techniques. **Bull. WHO**. 57, 767-771. 1979.

DAVIS, A., J.E. BILES, AND A.M. ULRICH, "Initial Experiences with Praziquantel in the Treatment of Human Infections due to *Schistosoma Haematobium*," **Bulletin of the World Health Organization**, 57(5): 773-779, 1979.

DANSO-APPIAH A., DE VLAS, S.J. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. **Trends Parasitol.** 18, 125-129, 2002.

DAY, T.A., BENNETT, J.L., PAX, R.A., Praziquantel: the enigmatic antiparasitic. **Parasitology Today**, 8, 342-344, 1992.

Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization. **Neglected tropical diseases: hidden successes, emerging opportunities**.http://whqlibdoc.who.int/hq/2006/WHO_CDS_NTD_2006.2_eng.pdf. Accessed May 3, 2007.

DOENHOFF , M. J., KUSEL J. R., . COLES G. C., CIOLI, D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 96, 465-469, 2002.

DOENHOFF, M.J., PICA-MATTOCCIA, L., 2006. Praziquantel for the treatment of schistosomiasis: its use for control in areas with endemic disease and prospects for drug resistance. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.** 4, 199–210. 2006.

DUVALL RH, DEWITT WB. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 16, 483-486, 1967.

EL KOUNI, M.H., DIOP, D., O'SHEA, P., CARLISLE R., SOMMADOSSI, J.P. Prevention of tubercidin host toxicity by nitrobenzylthioinosine 5-monophosphate for the treatment of schistosomiasis. **Antimicrob. Agents Chemother**. 33, 824-827, 1989.

EVANS DB, GUYATT HL (1997) Human behaviour, cost-effectiveness analysis and research and development priorities: the case of a schistosomiasis vaccine. **Trop Med Int Health** 2:A47–A54. 1997.

FALLON P.G., DOENHOFF, M.J. Drug-resistant schistosomiasis: Resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **Am J Trop Med Hyg**. 60, 83-88, 1994.

FARIAS, L.M.M., RESENDES, A.P.C., SABROZA, P.C., SOUZA-SANTOS, R., Analise preliminar do sistema de informação de controle da esquistossomose no período de 1999 a 2003. **Cad. Saúde Pública**, 23, (01), 235-239, 2007.

FAVRE TC, PIERI OS, BARBOSA CS, BECK L. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil **Rev Soc Bras Med Trop** 34: 569-576. 2001.

FAVRE, T.C., XIMENES, R.A.A., GALVÃO, A.F., PEREIRA, A.P.B., WANDERLEI, T.N., BARBOSA, C.S., PIERI, O.S. Reliability of current estimates of schistosomiasis prevalence in the Rainforest Zone of the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 101(Supl. I): 73-78, 2006.

FELDMEIER, H., CHITSULO, L., Therapeutic and operational profiles of metrifonate and praziquantel in *Schistosoma haematobium* infection. **Arzneimittelforschung**, 49, 557-565, 1999.

FENG, S. S., DONG Y., *In vitro* and *in vivo* evaluation of methoxypolyethyleneglycol–polylactide (MPEG–PLA) nanoparticles for small-molecule drug chemotherapy, **Biomaterials**. 28, 4154–4160, 2007.

FENWICK, A., WEBSTER, J.P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. **Curr. Opin. Infect. Dis**. 19, 577–582. 2006.

FERREIRA I. L. M.; SILVA, T. P. T. Mortalidade por esquistossomose no Brasil: 1980-2003. **Revista de Patologia Tropical**. 36 (1): 67-74. 2007.

FINKBEINER, H. The carboxylation of hydantoins. **J. Org. Chem.**, 30, 3414-3419, 1965.

FLORES-VILLANUEVA, P.O., ZHENG, X.X., STROM, T.B., STADECKER, M.J.

Recombinant IL-10 and IL-10/Fc treatment down-regulate egg antigen-specific delayed hypersensitivity reactions and egg granuloma formation in schistosomiasis. **J. Immunol.** 156, 9, 3315-3320, 1996.

FOSTER, R. A review of clinical experience with oxamniquine. **Trans.Royal Society Tropical Medicine and Hygiene.**81, 55-59.1987.

FROHBERG, H. AND SCHULZE SHENKING, M. Toxicological profile of praziquantel, a new drug against cestode and schistosome infections, as compared to some other schistosomicides.**Arzneimittelforschung.**31,555-565.1981.

FROHBERG, H. Result of toxicological studies on praziquantel. **Arzneimittelforschung.** 34, 1137-1144. 1984.

GARBA, A., TOURE, S., DEMBELE, R., BOSQUE-OLIVA, E., FENWICK, A., implementation of national schistosomiasis control programmes in West Africa. **TRENDS in Parasitology.** 22, 322-326, 2006.

GONNERT, R., ANDREWS, P. Praziquantel, a new broad-spectrum antischistosomal agent. **Z. Parasitenkd.** 52, 129-150, 1977.

GOODMAN, C.A., MILLS, A.J., The evidence base on the cost-effectiveness of malaria control measures in Africa. **Health Policy and Planning.**14, 301-312, 1999.

GNNTDC- <http://www.gnntdc.sabin.org/what/global.html> Global Network for Neglected Tropical Disease Control, acessado em: 14/08/2007.

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSK J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNEMBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem** 126: 131-138. 1982

GRYSEELS, B., POLMAN, K., CLERINX, J., KESTENS, L. Human schistosomiasis, **Lancet**, 368, 1106-1118, 2006.

GRZYCH, J. M., PEARCE, E., CHEEVER, A., CAULADA, Z.A., CASPAR, P., HEINY, S., LEWIS, F., SHER, A. Eggs deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. **J. Immunol.** 146:1322. 1991.

GUISSE, F., POLMAN, K., STELMA, F. F., MBAYE, A., TALLA, I., NIANG, M., DEELDER, A. M., NDIR, O.;GRYSEELS, B. Therapeutic evaluation of two different dose regimens of praziquantel in a recent *Schistosoma mansoni* focus in north em Senegal. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 56, 511-514. 1997.

GUYATT HL, Evans D. Desirable characteristics of a schistosomiasis vaccine: some implications of a cost-effectiveness analysis. **Acta Trop** 59:197–209. 1995.

HARDER, A. Chemotherapeutic approaches to schistosomes: current knowledge and outlook. **Parasitol. Res.** 88, 395-397, 2002.

HARDER, A. Milestones of helminthic research at Bayer. **Parasitology Research**, 88. 477-480, 2002.

HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. Eds. Goodman and Gilman, As bases farmacológicas da terapêutica. 10^a ed. Rio de Janeiro. McGraw-Hill, 2003.

HERNANDEZ, H. J. et al., Expression of class II, but not class I, major histocompatibility complex molecules is required for granuloma formation in infection with *Schistosoma mansoni*. **Eur. J. Immunol.** 27, 1170-1176, 1997.

HEWITSON JP, HAMBLIN PA, MOUNTFORD AP. Immunity induced by the radiation-attenuated schistosome vaccine. **Parasite Immunol** 27:271–280. 2005.

HOLVECK, J.C., EHRENBERG, J.P., AULT, S.K., ROJAS, R., VASQUEZ, J., CERQUEIRA, M.T., IPPOLITO-SHEPHERD, J., GENOVESE, M.A., PERIAGO, M.R. Prevention, control, and elimination of neglected diseases in the Americas: Pathways to integrated, inter-programmatic, inter-sectoral action for health and development. **BMC Public Health**; 7: 6. 2007.

HOTEZ PJ, MOLYNEUX DH, FENWICK A, OTTESEN E, EHRLICH SACHS S, SACHS JD. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. **PLoS Med**;3:e102, 2006.

HUNT, P., MJUR, M., Neglected diseases: A human rights analysis. Geneva, **World Health Organization**, 2007. (www.who.int/tdr/publications) acessado em 10 de agosto de 2007.

ISHIZAKI, T.; KAMO, E.; BOCHME, K. Double-blind studies of tolerance to praziquantel in Japanese patients with *Schistosoma japonicum* infections. **Bull. WHO.** 57, 787-791. 1979.

ISMAIL, M., BOTROS, S., METWALLY, A., WILLIAM, S., FARGHALLY, A., TAO, L.F., DAY, T.A., BENNETT, J.L.,. Resistance to praziquantel: direct Evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 60, 932–935. 1999.

ISMAIL, M., METWALLY, A., FARGHALY, A., BRUCE, J., TAO, L.F., BENNETT, J.L., Characterization of isolates of *Schistosoma mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 55, 214–218, 1996.

JAFFE, J.J., MAYMARIAN, E. E DORIMUS, H.M. Antischistosomal action of tubercidin administered after absorption into red cells. **Nature.** 230, 408-409. 1971.

JAMES, S.L. Role of Nitric Oxide in Parasitic Infections **Microbiological Reviews**, 59, 4, 533–547, 1995

JONES, G.L.; WOODBURY, D.M. Drug Dev. Res., 2, 333-355, 1982. In: CORTES, S.; LIAO, Z.K.; WATSON, D.; KOHN, H. Effect of structural modification of the hydantoin ring on anticonvulsant activity. **J. Med. Chem.**, 28, 601-606, 1985.

JOSENS, P.G., MATTHYS, K.E., BULT, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages, **Mediators Inflamm.** 4(2): 75–89. 1995;

JOSEPH, S., JONES, F.M., WALTER, K., FULFORD, A.J., KIMANI, G., MWATHA, J.K., KAMAU, T., KARIUKI, H.C., KAZIBWE, F., TUKAHEBWA, E., KABATEREINE, N.B., OUMA, J.H., VENNERVALD, B.J., DUNNE, D.W. Increases in human T helper 2 cytokine responses to *Schistosoma mansoni* worm and worm-tegument antigens are induced by treatment with praziquantel. **J. Infect. Dis.** 190:835-42. 2004.

KABATEREINE, N.B., BROOKER, S., KOUKOUNARI, A., KAZIBWE, F., TUKAHEBWA, E.M., FLEMING, F.M., ZHANG, Y., WEBSTER, J.P., STOTHARD, R., FENWICK, A. in press. Impacto on infection and morbidity of a national helminth control programme in Ugandan schoolchildren. **Bull World Health Org.** 2007.

KABATEREINE, N.B., FLEMING, F.M., NYANDINDI, U., MWANZA, J.C., BLAIR, L., The control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthes in East Africa. **Trends in Parasitology.** 22, 332-339, 2006.

KARANJA D M S, HIGHTOWER A W, COLLEY D G. Resistance to reinfection with *Schistosoma mansoni* in occupationally exposed adults and effect of HIV-1 co-infection on susceptibility to schistosomiasis: a longitudinal study. **Lancet**; 360: 592–6. 2002.

KATZ N, ALMEIDA K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. **Cienc Cult** 55: 38-43, 2003.

KATZ, N. Dificuldades no desenvolvimento de uma vacina para a esquistossomose mansoni. **Rev Soc Bras Med Trop** 32: 705-711, 1999.

KATZ, N., DIAS, E.P., ARAÚJO, N. AND SOUZA, C.P. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistentes a agentes esquistossomicidas. **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.** 7, 381-387.1973.

KATZ, N., PELLEGRINO, J., POMPEU-MEMÓRIA, J.M. Quantitative oogram method in Cebus monkeys experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.** 52, 917-919, 1966.

KATZ, N.; ROCHA, R. e CHAVES, A. Preliminary trials with praziquantel in human infections due to *Schistosoma mansoni*. **Bull. WHO.** 57, 781-785. 1979.

KEMP, H. A.; HUNTER, G. W.; WILKINS, O.P.; SMALLEY, H.; DASHIELL, M.A. Some ointments examined for protection against *Schistosoma mansoni* cercariae in preliminary tests. **Milit. Med.** 119, 1-10. 1956.

KIKUTH, W., GOENNERT, R. Experimental studies on the therapy of schistosomiasis. **Ann Trop. Med Parasitol.** 42, 256-267, 1948.

KINDHAUSER M, ed. **Communicable diseases 2002**: Global defence against the infectious disease threat. Geneva, World Health Organization, 2003 (WHO/CDS/2003.15).

KING, C.H., DICKMAN, K., TISCH, D.J. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. **Lancet**, 365, 1561-1569, 2005.

KOROLKOVAS, A. **Fundamentos de farmacologia molecular: base para o planejamento de fármacos**. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo. 1974.459p.

KUBI, J. **Imunologia** , 4th ed. New York, W.H. Freeman and Company, 2002.

LAMYMAN, M.J.; NOBLE, D.J.; NARANG, S.; DEHALVI. N. Small bowel obstruction secondary to intestinal schistosomiasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** , 100, 885-887, 2006.

LE GROS, G., SHLOMO, Z., SASSON, B., SEDER, R., FINKELMAN, F.D., PAUL, W.E. Generation of interleukin 4 (114)-producing cells *in vivo* and *in vitro*: Ilr2 and ILr4 are required for *in vitro* generation of U-4-producing cells. **J. Exp. Med.** 172, 921-929, 1990.

LEOPOLD, G. UNGETHUM, W.; GROLL, E.; DIEKMANN, H.W.; NOWAK, H.; WEGNER, D.H. Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drugs against schistosomes and cestodas. An example of a complex study covering both tolerance and pharmacokinetics. **Eur. J. Clin. Pharmacol.** 14, 281-291. 1978.

LENZI HL, KIMMEL E, SCHECHTMAN H, PELAJO-MACHADO M, VALE BS, PANASCO MS, LENZI JA. Collagen arrangement in hepatic granuloma in mice infected with *Schistosoma mansoni*:dependence on fiber radiation centers. **Braz J Med Biol Res** 32: 639-643. 1999.

LIANG, Y.S., COLES, G.C., DOENHOFF, M.J., SOUTHGATE, V.R. *In vitro* responses of praziquantel-resistant and susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **Int. J. Parasitol.** 31, 1227–1235. 2001.

LICHTENBERG, F.V. Studies on granuloma formation. III. Antigen sequestration and destruction in the schistomose pseudotubercle. **Am. J. Pathol.**, 45: 75-93, 1964.

LOPES DE FARIAS et al. **Patologia Especial com Aplicações Clínicas**. 2a Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan. 362-381, 1999.

LUKACS, N. W., BOROS, D.L. Utilization of fractionated soluble egg antigens reveals selectively modulated granulomatous and lymphokine responses during murine schistosomiasis mansoni. **Infect Immun**. 60(8): 3209–3216. 1992.

LUKACS, N.W., CHENSUE, S.W., STRIETER, R.M., WARMINGTON, K., KUNKEL, S.L. Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha-inducible intercellular adhesion molecule-1. *J. Immunol.* 152, (12), 5883-5889, 1994.

LUTTERMOSER, G.W.; BOND, H.W. *J. Parasitol.*, 40, 33, 1954 *In*: WERBEL, L.M.; ELSLAGER, E.F. Antischistosomal effects of 5-(2,4,5-trichlorophenyl)-hydantoin and related compounds. **J. Med. Chem.**, 20, (12), 1569-1572, 1977.

MCLAREN, D.J., JAMES, S.L. Ultrastructural studies of the killing of schistosomula of *Schistosoma mansoni* by activated macrophages *in vitro*. **Paras. Immunol.** 7, (3), 315-331, 1985.

MACMICKING, J., XIE, Q-W., NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Ann. Rev. Immunol.** 15, 323-350, 1997.

MAGNUSSEN, P. Treatment and re-treatment strategies for schistosomiasis control in different epidemiological settings: a review of 10 years experiences. **Acta Trop.** 86, 243-254, 2003.

MARTON, J.; ENISZ, J; HOSZTAFI, S.; TÍMÀR, T. Preparation and fungicidal activity of 5-substituted hydantoins and their 2-thio analogs. **J. Agric. Food Chem.**, 41, (1), 148-152, 1993.

MATHEW, R.C., BOROS, D.L. Anti-L3T4 antibody treatment suppresses hepatic granuloma formation and abrogates antigen-induced interleukin-2 production in *Schistosoma mansoni* infection. **Infect Immun**. 54(3): 820–826. 1986.

MATSUYAMA, H., TAKAHASHI, H., WATANABE, K., FUJIMAKI, Y., AOKI, Y. The involvement of cyclic adenosine monophosphate in the control of schistosome miracidium cilia. **J. Parasitol.** 90, 8-14, 2004.

MCMANUS, D.P., BARTLEY, P.B. A vaccine against asian schistosomiasis. **Parasitology Internacional**, 53, 163-173, 2004.

MELO, A.L., BARCELLOS, N.M.S., DEMICHELI, C., FRÉZARD, F. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. **Int. J. Pharm.** 255, 227–230. 2003.

MERCER, J.G.; CHAPPELL, L.H. *Schistosoma mansoni*: effect of maintenance *in vitro* on the physiology and biochemistry of adult worms. **Parasitology**, 90, 339-349, 1985.

MINARD, P., DEAN, D.A., JACOBSON, R.H., VANNIER, W.E., MURRELL, K.D. Immunization of mice with cobalt-60 irradiated *Schistosoma mansoni* cercariae. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 27, 76–86. 1978.

MINISTÉRIO DA SAÚDE – BRASIL. Produção oficial de medicamentos: **diagnóstico, limitações e perspectivas**. Brasília: Secretaria de Ciência e Tecnologia e Insumos Estratégicos, Ministério da Saúde; 2003.

MONTESANO, M.A., FREEMAN Jr., G.L., SECOR, W.E., COLLEY, D.G. Immunoregulatory idiotypes stimulate T helper 1 cytokine responses in experimental *Schistosoma mansoni* infections. **J. Immunol.** 158, (8), 3800-3804, 1997.

MOREIRA, L.S.A., PILO-VELOSO, D., MELLO, R.T., COELHO, P.M.Z., NELSON, D.L. A study of the activity of 2-(alkylamino)-1-phenyl-1-ethanethiosulfuric acids against infection by *Schistosoma mansoni* in a murine model. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 101, 385-390, 2007.

MRAZEK, M.F., MOSSIALOS, E. Stimulating pharmaceutical research and development for neglected diseases **Health Policy**, 64, 75-88, 2003.

NEVES, D.P. **Parasitologia Humana** 11^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NWAKA, S., HUDSON, A. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases **Nature Reviews Drug Discovery** | AOP, published online 13 October; doi:10.1038/nrd2144. 2006.

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), 343-348, 2004.

OLIVER, L., STIREWALT, M.A. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. **The Journal of Parasitology**. 38, 19-23, 1952.

OZKIRIMLI, S.; HAMALI, O. Synthesis and hypnotic activity of some 2-thioxo-4,5-imidazolidinedione derivatives. **IL Farmaco**, 50,(1), 65-67, 1995.

PANG, S.N.J., Final report on the safety assessment of polyethylene glycols (PEGs)-6, -8, -32, -75, -150, -14M, -20M. **J. Am. Coll. Toxicol.** 12, 429–457. 1993.

PARISE FILHO, R., MENEZES, C.M.S., PINTO, P.L.S., PAULA, G.A., BRANDT, C.A., SILVEIRA, M.A.B. Design, synthesis and *in vivo* evaluation of oxamniquine methacrylate and acrylamide prodrugs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 15, 1229-1236, 2007.

PASSOS, A.D.C., AMARAL, R.S. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 31 (Supl. II), 61–74. 1998.

PATTON, E.A., LA FLAMME, A.C., PEDRAS-VACONCELOS, J.A., PEARCE, E.J. Central role for interleukin-4 in regulating nitric oxide-mediated inhibition of T-cell proliferation and gamma interferon production in schistosomiasis, **Infect. Immunol**, 70, (1), 177-184, 2002.

PELLEGRINO, J., FARIA, J. The oograma method for the screening of drugs in *S. mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 14: 363-369, 1965.

PELLEGRINO J, KATZ N. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis. IV. Oogram studies with nicarbazin, an egg-suppressive agent. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 11: 215-221, 1969.

PESSOA, S.B., MARTINS A.V. **Parasitologia Médica** 10^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 1988. 872 p.

PHILLIPS, S.M., COLLEY, D.G. Immunologic aspects of host responses to schistosomiasis: resistance, immunopathology, and eosinophil involvement. **Prog. Allergy**, 24:42. 1978.

PHILLIPS, S.M., LAMMIE, P.J. Immunopathology of granuloma formation and fibrosis in schistosomiasis, **Parasitol. Today**. 2, (11), 296-302, 1986.

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**, 101 (Supl. I) 313-316, 2006.

POLAK, M., MONTENEGRO, M.R., MEIRA, J.A., CONTE, V.A., VESPEJO, H., FRANCHINI, F., PONTES, J.F. *Schistosoma mansoni*: pathological changes in the liver different stage of the disease by means of laparoscopy and needle biopsy. **Rev. Int. Med. Trop. São Paulo**. V.1, p. 18-40, 1959.

PRATA A. Esquistossomose mansoni. In: Veronesi R, Foccacia R. (ed) **Tratado de infectologia**. Atheneu, São Paulo, p. 1354-1372. 1997.

PYRRHO, A.S., RAMOS, J.A., MOURA NETO, R., SILVA, C.S., LENZI, H.L., TAKIYA, C.M., GATTASS, C.R. Dexamethasone, a Drug for Attenuation of *Schistosoma mansoni* Infection Morbidity. **Antimicrob. Agent Chem.**, 3490–3498, 2002.

RAMIAH, K.D., DAS, P.K., MICHAEL, E., GUYATT, H. the economic burden of lymphatic filariasis in India. **Trends Parasitol. Today**, 16, 251-253, 2000.

RASO, P & BOGLIOLO, L. **Esquistossomose mansônica**. São Paulo. Universidade de São Paulo - 5, 77, 1970.

RASO, P., BERNARDES, R.C., TAFURI, W.L., BOGLIOLO, L. , NEVES, J. As dimensões do granuloma causadas pelos ovos do *Schistosoma mansoni* no fígado humano. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 12 (1-6): 45, 1978.

REDMAN, C.A., ROBERTSON, A., FALLON, P.G., MODHA, J., KUSEL, J.R., DOENHOFF, M.J., MARTIN, R.J. Praziquantel: an urgent and exciting challenge. **Parasitol. Today**. 12, (1), 1996.

REISER, H., STADECKER, M.J. Costimulatory B7 molecules in the pathogenesis of infectious and autoimmune diseases. **N. Engl. J. Med.** 335, (18), 1369-1377, 1996.

RENSLO, A.R., MCKERROW, J.H., Drug discovery and development for neglected parasitic diseases. **Nat. Chem. Biol.**, 2, 12, 2006.

RESENDE, A.P.C., SOUZA-SANTOS, R., BARBOSA, C.S. Internação hospitalar e mortalidade por esquistossomose mansônica no Estado de Pernambuco, Brasil, 1992/2000. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, 21(5):1392-1401, 2005

REY, L. Esquistossomose mansoni. *Bases da Parasitologia Médica*. 2º ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 153-171, 2002.

REY, L. **Parasito e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África**, c. 32-35, 351-389, 2º edição, 2001.

RIBEIRO DE JESUS, A., SILVA, A., SANTANA, L.B., MAGALHÃES, A., ALMEIDA DE JESUS, A., ALMEIDA, R.P., REGO, M.A.V., BURATTINI, M.N., PEARCE, E.J., CARVALHO, E.M. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute Schistosomiasis mansoni. **J. Inf. Dis.** 185, 98-105, 2002.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, G., ALMEIDA, S.V., LEITE, L.C.C., Schistosomiasis-a century searching for chemotherapeutic drugs, **Parasitol Res.** 99, (05), 505-521, 2006.

RIDI, R.E., OZAKI, T., INABA, T., ITO, M., KAMIYA, H., *Schistosoma mansoni* oviposition *in vitro* reflects word fecundity *in vivo*: individual-, parasite age- and host-dependent variations. **Int. J. Parasitol.** 27, (04), 381-387, 1997.

ROCHA FILHO, J.A. **Síntese e avaliação da atividade antimicrobiana dos derivados arilazos e arilidenos 3-benzil-4-tiox-imidazolidinônicos**. Dissertação de mestrado apresentada a Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Depto de Farmácia, UFPE, Recife - PE, Brasil, 1993.

SABADINI, P.I.P., DIAS, L.C.S. Altered response of Strain of *Schistosoma mansoni* to oxaminiquine and praziquantel. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 97, 381-385. 2002.

SANTOS, R. O. **Dinâmica da produção e reabsorção da fibrose em granulomas esquistossomóticos intestinais (estudo Imuno-Histopatológico, Morfométrico e Bioquímico na Esquistossomose Murina Experimental)**. 1990. Dissertação de Mestrado, Patologia Humana – Universidade Federal da Bahia – UFBA.

SEDER, R.A., PAUL, W.E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+T cells. **Ann. Rev. Immunol.** 12, 635-673, 1994.

SEUBERT, J.; POHLKE, R.; LOEBICH, F. Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against schistosomes and cestodes. **Experientia**, 33, 1036-1037. 1977.

SEXTON, W.A., Chemical Constitution and Biological Activity, 3rd ed., Spon, London 1963. in: KOROLKOVAS, A. **Fundamentos de farmacologia molecular: base para o planejamento de fármacos**. Editora da Universidade de São Paulo. São Paulo. 1974.459p.

SHEKHAR, K.C. Schistosomiasis drugs therapy and treatment considerations. **Practical therap.**42 (3)379-405, 1991.

SHER, A., FIORENTINO, D., CASPAR, P., PEARCE, E., MOSMANN, T. Production of IL-10 by CD4 T lymphocytes correlates with down-regulation of Th1 cytokine synthesis in helminth infection. **J. Immun.** 147, 2713-2716, 1991.

SHER, A., COFFMAN, R.L., HIENY, S., SCOTT, P. & CHEEVER, A.W. Interleukin 5 is required for the blood and tissue eosinophilia but not granuloma formation induced by Infection with *Schistosoma mansoni*. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 87: 61, (1990).

SIDDIQUI, AFZAL A.; AHMAD, GUL; DAMIAN, RAYMOND T.; KENNEDY, RONALD C. Experimental vaccines in animal models for schistosomiasis, **Parasitol Res** 102:825–833, (2008).

SILVA, I.M., THIENGO, R., CONCEIÇÃO, M.J., REY, L., LENZI, H.L., PEREIRA FILHO, E., RIBEIRO, P.C. Therapeutic failure of praziquantel in the treatment of *Schistosoma haematobium* infection in Brazilians returning from Africa. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. 100, 445-449, 2005.

SILVA, P. G. **Determinação da Atividade Esquistossomicida de Derivado Imidazolidínico**. 2006. Dissertação de Mestrado, Programa de pós Graduação em Ciências Biológicas (CCB)-Universidade Federal de Pernambuco - UFPE,.

SINGH K. P., GERARD H. C., HUDSON A. P. & BOROS D. L., Expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors during the resorption of schistosome egg-induced fibrosis in praziquantel-treated mice. **Immunology** 111: 343-352. 2004.

SMITH, D.A., BICKLE, Q.D., KAYE, P. M. Resistance induced by drug abbreviated *Schistosoma mansoni* infections: treatment with the drug Ro11-3128 leads to enhanced antigen presentation. **Immunology**. 82, 419-426, 1994.

SMYTHIES, L.E., BETTS, C., COULSON, P.S., DOWLING, M.A., WILSON, R.A. Kinetics and mechanism of effector focus formation in the lungs of mice vaccinated with irradiated cercariae of *Schistosoma mansoni*. **Parasite Immunol.** 18, (7), 359-369, 1996.

SOARES, A.L.M.; **Síntese e avaliação da atividade biológica de novos derivados Arilazo-Imidazolidínicos e Arilideno-Tiazolidínicos frente a vermes adultos de *Schistosoma mansoni* (Cepa BH).**2004.140p. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

SOLIMAN, R.; FEID-ALLAH, H.M.; MOHAMED, H.F. Preparation and antidiabetic activity of cyclic sulfonylthiourea derivatives **J. Pharm. Sci.**, 70, 952-956, 1981.

STADECKER, M.J., HERNANDEZ, H.J. The immune response and immunopathology in infection with *Schistosoma mansoni* a key role of major egg antigen Sm-p40. **Parasite Immunol.** 20, (5), 217-221, 1998.

STANDEN, D. The effect of temperature light and salinity upon the hatching of the ova of *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 45, 225-241, 1952.

STEINMANN P, KEISER J, BOS R, TANNER M, UTZINGER J. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **Lancet Infect Dis**, 6:411-425. 2006.

STELMA, F. F., TALLA, A., SOW, S., KONGS, A., NIANG, M., POLMAN, K., DEELDER, A. M. & GRYSEELS, B. Efficacy and side-effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 53, 167-170. 1995.

STEK, M.F., MINARD, P., DEAN, D.A., HALL, J.E., 1981. Immunization of Baboons with *Schistosoma mansoni* Cercariae attenuated by gamma irradiation. **Science** 212, 1518–1520. 1981

SWAIN, S.L., WEINBERG, A.D., ENGLISH, M., HUSTON, G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. **J. Immunol.** 145, (11), 3796-3806, 1990.

TCHUEN TCHUENTE!, L. A., BARRAL, V., IMBERT-ESTABLET, D., MORAND, S., NICOLETTE, R., JOURDANE, J. *Schistosoma mansoni*: lack of prezygotic reproductive isolation between African and South American strains. **Exp. Parasitol.** 80, 323±327, 1995.

THOMAS H.; GÖNNERT, R. The efficacy of praziquantel against cestodes in animals. **Z. Parasitenkd.** 52, 117-127. 1977.

Trachoma.<http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index2.html>. Acessado em : 30 maio de 2007.

TROUILLER, P., OLLIARO, P.L., Drug development output from 1975 to 1996: what proportion for tropical diseases? **Int. J. Infect. Dis.** 3, 61-63, 1999.

UTZINGER, J., XIAO, S.H., N'GORAN, E.K., BERGQUIST, R., TANNER, M., The potential of artemeter for the control of schistosomiasis. **Int. J. Parasitol.** 31 (14) 1549-1562, 2001.

UTZINGER, J., KEISER, J., SHUHUA, X., TANNER, M., SINGER, B.H. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trial. **Antimicrob Agents chemother.** 47, 1487-1495, 2003.

UTZINGER J, KEISER J. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. **Expert Opin Pharmacother**; 5:263–285. 2004

VAN DER WERF, M. J., DE VLAS, S. J., BROOKER, S. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan África. **Acta Tropica**, 86: 125-139. 2003.

WALTER, R.D., ALBIEZ, E.J. interaction of amoscanate with the cyclic AMP-phosphodiesterases from *Schistosoma mansoni*, *Onchocerca volvulus* and bovine heart. **Tropenmed Parasitol.** 35, 78-80, 1984.

WARE, E. The chemistry of hydantoin, **Chem. Rev.** 46, 403, 1950.

WARREN, K.S., DOMINGO, E.S., COWAN, R.B.T. Granuloma formation around schistosome eggs as a manifestation of delayed hypersensitivity. **Am. J. Pathol.** 51, 735-756, 1967.

WEBBE G. Schistosomiasis: Some advances. **J. Br Med**; 283:1104–9. 1981.

WEINER, H.L. Oral tolerance. Proceedings **National Academy of Sciences** 91, 10762-10765, 1994.

WERBEL, L.M.; ELSLAGER, E.F. Antischistosomal effects of 5-(2,4,5-trichlorophenyl) hydantoin and related compounds. **J. Med. Chem.**, 20,(12),1569-1572, 1977.

WHO - World Health Organization Report of the WHO informal consultation on schistosomiasis control. Geneva, World Health Organization, 1998. Document WHO/CDS/CPC/SIP/99.2.

WHO,. **Report of the WHO information Consulation on Schistosomiasis Control.** Document WHO/CDS/CPC/SIP/99.2. World Health Organization. Geneva. 1999, World Health Organization. Drugs Used in Parasitic Diseases

WHO, World Health Organization. Essential Medicines. Model list.13th edition. Revised in April, 2003.

WILLIAM, S., BOTROS, S., ISMAIL, M., FARGHALLY, A., DAY, T.A., BENNETT, J.L., Praziquantel-induced tegumental damage *in vitro* is diminished in schistosomes derived from praziquantel-resistant infections. **Parasitol.** 122, 63–66. 2001.

WILLIAM, S., BOTROS, S., Validation of sensitivity to praziquantel using *Schistosoma mansoni* worm muscle tension and Ca²⁺-uptake as possible *in vitro* correlates to *in vivo* ED50 determination. **Int. J. Parasitol.** 34, 971–977. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of neglected tropical diseases** (NTD). http://www.who.int/neglected_diseases/en/. Accessed July 20, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The Control of Schistosomiasis.** Second report of the WHO Expert Committee on the Control of Schistosomiasis. Geneva. WHO Technical Report Series, n. 830, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO medicines strategy:** framework for action in essential drugs and medicines policy 2000-2003. Geneva: WHO, 2000.

WYNN, T.A., ELTOUM, I., CHEEVER, A.W., LEWIS, F.A., GAUSE, W.C., SHER, A. Analysis of cytokine mRNA expression during primary granuloma formation induced by eggs of *Schistosoma mansoni*. **J. Immunol.** 151, (3), 1430-1440, 1993.

XIAO,S.H., SHEN,B., UTZINGER,J., CHOLLET,J., TANNER,M. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harbored in mice treated with artemether. **J. Parasitol.** 86(5),p.1125-1132, 2000.

YALKOWSKY S. H., JAIN, P. Solubilization of poorly soluble compounds using 2-pyrrolidone. **Int. J. Pharmaceut.** 342, 1–5, 2007.

YUE, W-J., YU, S-H., XU, X-J. Failure to induce resistance of *Schistosoma japonicum* to praziquantel. **S.E.Asian J. Trop. Med. Publ. Health**, 21, 85-89, 1990.

ZANIN, S.M.W., MIGUEL, M.D., CHIMELLI, M.C., OLIVEIRA, A.B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Visão Acadêmica**, Curitiba, 03, (01), 13-18, 2002.

ZANOTTI-MAGALHÃES, E.M.; MAGALHÃES, L.A.; CARVALHO, J.F. Relação entre a patogenicidade de *Schistoma mansoni* em camundongos e a

susceptibilidade do molusco vetor. II. Número de ovos nas fezes e número e o tamanho dos granulomas nas vísceras. **Rev. Saúde Pública**, 27 (6): 412-20, 1993.

ZOU, W. L., YANG, Z., ZANG, Y.J., LI, D. J., LIANG, Z. P., SHEN, Z.Y. Inhibitory effects of prostaglandin E1 on activation of hepatic stellate cells in rabbits with schistosomiasis. **Hepatobiliary Pancreat Dis Int**, 6(2), 2007.

Schistosomicide activity of derivate 5-(4-chloro-arylazo)-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-one

**A ser submetido à Revista Acta tropica
ISSN: 0001-706X**

Schistosomicide activity of derivate 5-(4-chloro-arylazo)-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-one

Autors:

¹Andréa Cristina Apolinário da Silva*

²Juliana Kelle de Andrade Lemoine Neves*

³João Inácio Irmão**

⁴Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque***

⁵Vláudia Maria Assis Costa***

⁶Valdênia Maria Oliveira de Souza***

⁷Paloma Lys de Medeiros****

⁸Eliete Cavalcanti da Silva****

⁹Maria do Carmo Alves de Lima*

¹⁰Ivan da Rocha Pitta*

¹¹Suely Lins Galdino*

*Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF) /Departamento de Antibióticos, **Departamento de Medicina Tropical, ***Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), ****Departamento de Citologia, Embriologia e Histologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/no, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brasil

Abstract: Previous studies conducted with the Imidazolidinic derivative 5-(4-chloro-arylazo)-3-benzil-4-tioxo-imidazolidin-2-one (LPSF/PT05) has activity outstandingly against adult *S. mansoni* worms (Cepa BH) when evaluated *in vitro*. This present work *In vivo* studies the derivative LPSF/PT05 was administered orally in Tween 80 and solution salines, Tween 80/oil/water (70:30), and in solid dispersion with PEG (Polyethylene glycol). Only the solid dispersion with PEG apresent effect schistosomicidal. Were tested four doses: 3, 10, 30, and 100 mg/kg body weight. This treatment regimens significantly reduced numbers of recovered *S. mansoni* worms, for

dose 10 and 30 mg/kg the reduced numbers of worms was approximately 50%, and the dose 100 mg/kg showed the greatest reduction in the number of worms, 68%. The improvement of activity schistosomicidal of imidazolidinic derivative was due to improvement in solubility of a swap in last preparation. Oograma pattern was low alteration the treats mice. The largest reduction in the number of worms in the liver to a dose of 100 mg / kg corroborates with the suppression cellular immune response that has effect in both to Th1 and Th2 cells and the histopathological data which showed a down-modulation in granulomatous response, produced an effective action against the hepatic damaging effect, caused by *S. mansoni* infection. This response may be associated with the effect of a swap in cellular immune response which produces suppression in cells response Th1 and Th2, and this suppression results in a reduction of granulomatous response.

Keywords Schistosomiasis, *Schistosoma mansoni*, Studies *in vivo*, Derivative Imidazolidione, Immune response, Analysis histopatological

1. Introduction

The only drugs currently available for the treatment of schistosomiasis mansoni are praziquantel and oxamniquine (WHO 2002). Praziquantel (2-cyclohexylcarbonyl-1,2,3,6,7,11b-hexa-hydro-4H pyrazino{2,1-a}isoquinoline-4-one) is currently considered the drug of choice for the treatment of schistosomiasis because of its efficacy against all schistosome species (Chen, 2005). Oxamniquine acts only on *S. mansoni* and is nowadays mainly used in Brazil (Fenwick et al., 2003; Olds 2000). The schistosomiasis, after malaria, is the second most significant parasitic disease in the world in terms of socioeconomic and public health importance, and it is estimated that 207 million people are infected in 74 countries of Latin American, África and Asia (Steinmann et al., 2006; Farley 1991), more than 779 million people exposed to the risk of infection, the mortality estimate up to 280 000 deaths annually in sub-Saharan África alone (Blanchard 2004; Van der Werf et al., 2003; King et al., 2005, Steinmann et al., 2006, Fenwick 2006). Estimates of the global burden due to schistosomiasis range from 1.7 to 4.5 million disability-adjusted life year (DALYs) lost (Utzinger et al., 2004, Hotez et al., 2006, Brooker , Utzinger, 2007) or even higher (King et al., 2005).

Chemotherapy is the current strategy for schistosomiasis control (WHO, 1999); the control of Asian schistosomiasis has large-scale chemotherapy using the highly effective drug praziquantel (Macmanus 2000). However, the mass treatment does not prevent reinfection (Macmanus, Dalton 2006). Data assembled over the past five years suggest that schistosomiasis is re-emerging in parts of China (Xiao-Nong 2005). Furthermore, despite the fact there is not yet clear-cut evidence for the existence of praziquantel resistant schistosome strains, decreased susceptibility to the drug has been reported in several countries (Macmanus, Dalton 2006). The reliance on one single antischistosomal drug is alarming and the scientific community has called for research and development of novel and inexpensive drugs against schistosomiasis (Engels et al., 2002; Utzinger et al., 2003).

The imidazolidine, a pentagonal heterocyclic, are a broad class of bioactive compounds with the diversity biological activity (Jones et al., 1982). The imidazolidine system has antifungal and antimicrobial properties (Marton et al., 1993) schistosomicidal (Werbel et al., 1977; Benazet et al., 1974), hypnotic (Henze et al., 1943), hypoglycemic (Ware, 1950; Soliman et al., 1981).

Niridazol, 1-(5-nitro-thiazol-2-yl)-imidazolidin-2-one, the drug used in the last century, has been widely used for clinical purposes. The drug received considerable attention, probably because it was one of the early alternatives being administered orally (Cioli et al., 1995).

At present, the schistosomacidal properties of imidazolidine derivatives has been shown in the case of adult *S. mansoni* worms *in vitro* studies (Oliveira et al., 2004; Albuquerque et al., 2005 and Pitta et al., 2006).

Original evidence from the literature, this paper has aim to search for new agents schistosomicides activity, this work presents studies with new derivatives imidazolidinics evaluated *in vivo* against adult worms of *S. mansoni*.

2. Materials and methods

2.1. In vivo studies with S. mansoni

The BH strain of *S. mansoni* was kept in the laboratory after it had passed through *Biomphalaria glabrata* molluscs and Swiss mice (*Mus musculus*). Mice weighing between 20 and 25 g were infected by exposure to a cercarian suspension of *S. mansoni* with approximately 100 cercarias, using the tail immersion technique (Olivier and Stirewalt 1952). After 49 days (adult infection) postinfection, groups of ten animals were treated orally with derivate imidazolidin at 3, 10, 30, 100 mg/kg doses for five days consecutives. The control group received only the vehicle without derivate. 15 days posttreatment, animals were sacrificed by cervical displacement. All *S. mansoni* worms were removed and counted. The experimental procedure used for the quantitative oogram test, the proportion of eggs in various stages of maturity was estimated according to Pellegrino and colleages (1965). One hundred eggs per oogram were randomly chosen, qualified by microscopic examination, and classified as dead, immature (stage 1°, 2°, 3°, 4°) and mature in all infected and treated groups and the mesenteric veins perfusion technique.

The experiments were approved by the Federal University of Pernambuco's Animal Experiments Ethics Committee, Process nº.009645/2006-23, in accordance with Law 9605 Article 32 Decree 3179. Art 17.

2.2. Preparations for oral administration of the derivative imidazolidinic

Animals previously selected and properly weighed were submitted to common diet with free access to water, before the administration of three different formulations containing the LPSF/PT05. In the first formulation, drops tween 80 were used for solubilization of LPSF/PT05 in saline. The second formulation was prepared by emulsion with Tween 80/oil/water (70:30) in LPSF/PT05 and finally, dispersions solid containing 10 % of LPSF/PT05, prepared using hydrophilic polymer polyethylene glycol (PEG) by the method of solvent were solubilized in water. The administration of the formulations was done orally, for animal, remaining concentrations of 3, 10, 30, and 100 mg/Kg of LPSF/PT05, for five days consecutives. The group control, free of LPSF/PT05, was submitted to the same conditions for testing the other groups.

2.3. Immunology

Spleen cell suspensions were prepared from mice *albino swiss* infected with *S. mansoni* and treated with 3, 10, 30 or 100 mg/Kg of LPSF-PT5 previously, depleted of erythrocytes by hypotonic lysis with distilled water and resuspended in RPMI 1640 complete medium containing 5% FCS, 10 mM L-glutamine, penicillin (100 U/mL) and streptomycin (100 µg/mL) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Spleen cells were cultured in 48 wells flat-bottom plates at 5×10^6 cells per well incubated 37 °C, 5% CO₂ for 24 and 72 hours, under stimuli with SEA (*Schistosoma mansoni* soluble egg antigen) 20 µg/mL or ConA (5 ng/mL). Supernatants from the cultures were harvested for cytokine and NO determination. For each experiment, the spleens cells of six mice were pooled.

2.3.1. Measurement of nitrite production and detection of cytokines

Nitrite (NO_2^-) accumulation in 72 h supernatants of cultured cells was used as an indicator of NO production and was determined by the Griess reaction with sodium nitrite as a standard as previously described (detection limit: 1.56 μM). Fifty microliters of supernatant were incubated for 10 min, in the dark, at room temperature, with 50 μl of a freshly mixed solution of N-[1-naphthyl]-ethylenediamine (1mg/mL), sulfanilamide (10 mg/mL), 5% phosphoric acid in distilled water. The absorbance was measured at 540 nm. Production of IFN- γ , IL-10 and IL-4 was measured in supernatants of spleen cells culture harvested after 24 or 72 hours, using a two-site sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Levels of IL-4, IL-10 and IFN- γ in culture supernatants were determined using antibody pairs and recombinant cytokines from PharMingen, following the manufacturer's instructions, followed by streptavidin-peroxidase (Sigma). Reaction was developed using the ABTS [(2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)], Sigma Chemical, St. Louis, Mo., USA) peroxidase substrate (Sigma) and read at 405 nm. The results are expressed as the arithmetic mean accompanied by the standard deviation. Means of control and experimental groups were compared by ANOVA and Mann-Whitney Test. Differences were considered to be significant when $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using Graph Pad INSTAT3.

2.4. Histopathology

Tissue samples (liver and intestines) were removed and were fixed immediately in 10 % neutral-buffered formalin, embedded in paraffin sectioned, and stained with mayer's hematoxylin and eosin, and Masson's trichrome stain for collagen content (Kiernan, 1999). The analysis used a video microscope system (LEICA DMIL microscope, LEICA DFC 280 video-camera). Granuloms with visible

eggs in the centre were analyzed (counted). The granuloms were classified according to Costa-Silva (2002). Granuloms of three liver sections and four intestine sections were counted per group of mice; significant differences between the animal groups were assessed using analysis of variance (one way ANOVA) with Tukey pos hoc test. Measurements with p-values $\leq 0,05$ were considered significantly different.

3. Results

3.1. Studies in vivo

The preparation LPSF/PT05 with Tween 80 in saline doesn't produced effects significant on evaluated parameters. In emulsion Tween/oil/water (70:30) was a 50 % reduction in the number of worms recovered from infected animals and treated at a dose Only of 10 mg/Kg. The solid dispersion with PEG containing 10 % of LPSF/PT05 shower a greater reduction in the number of worms when compared to the results seen in previous formulations, as the fig. 1:

Insert FIG.1

The complexed PEG with imidazolidinic derivate produces the reduction in the recupered worms number the approximately 50 % in concentrations of the 10 and 30 mg/kg and the concentration of 100 mg/kg the reduction in the worms number of 68 %. These results reinforced the hypothesis of the purpose of the effect schistosomicide observed when measured against adults worms of *S. mansoni in vitro*. There was no significant alteration in the oogram pattern when comparison was made with specimens recovered from untreated mices. The burden of parasitic worms and residual presence of all stage of development of eggs, maintaining a profile of the standard oogram.

3.3. IFN- γ , IL-4 and IL-10 and Nitric Oxide production after treatment of S. mansoni infected mice with LPSF/PT5

As shown in Fig. 2a, spleen cells collected from infected mice after treatment with the dispersion in solid PEG containing 10 % of LPSF/PT05 produced much higher levels of IFN- γ than cells obtained from infected control mice, particularly animals treated with 30 mg/Kg that produced 4 folds higher than control. Surprisingly, IFN- γ production levels by spleen cells cultures stimulated with ConA were significantly reduced in treated mice with 10, 30 and 100 mg/Kg of the drug. We also tested IL-4 production and we found a significantly suppression of this cytokine by the cultures stimulated with Con A at animals treated with 100 mg/Kg of LPSF/PT5. The other doses didn't reduced production of IL-4 significantly. IL-4 production by SEA stimulated cultures was higher in treated animals cultures, however the levels production of this cytokine were not significant (Fig. 2b).

Regarding IL-10 production, this cytokine was below detection levels in spleen cells cultures from days 60 of infection for both control and treated mice. At this point of infection, the nitric oxide production wasn't affected by the treatment of infected animals. Controls and treated mice had no significant differences in production of NO. However, the cultures stimulates with SEA had higher production of nitric oxide by 10, 30 and 100 mg/Kg treated mice but not statistically significant (Fig. 2c).

Insert FIG.2

3.4. Histopathological evaluation of tissues (livers and intestines) of mice infected by Schistosoma mansoni and treated by LPSF/PT05 in solid dispersion with PEG

The histopathological analysis showed that treatment of infected mice with the dispersion in solid PEG containing 10 % of LPSF/PT05 in the doses of 10, 30 or 100 mg/Kg per day produced an effective action against the hepatic damaging effect, caused

by *S. mansoni* infection, as shown by reducing the number of worms especially in liver and by down-modulation of granulomatous response (fig. 3) to avoid development of host pathology. In an attempt to follow the evolution of the disease in the histological sections of the tissues, the intestine (jejunum) of these animals treated with LPSF/PT-05 (3 and 100 mg/Kg) presented rare granulomas in submucosa layers (Fig. 3d and J).

Insert Fig.3

From the point of general pathology periovular schistosomal granulomas are dynamically similar to wound healing, with production of granulation tissue, which becomes less vascularized with the time, while the cicatrial fibrous tissue becomes more compact and mature. We observed a decrease of the exudative-productive stages for all concentrations (Table 1), with considerably significant for the 10 and 100 mg/Kg and similar response did not observed with the involutinal stages.

Insert Table 1

The average of intestine granuloma numbers (Table 2) for the exudative-productive granuloma stages didn't show difference when compared with the control. The mice treated with 3 mg/Kg (LPSF/PT05-PEG) demonstrate a significant increase of the number of involutinal granuloma stages.

Insert Table 2

4. Discussion

Chemotherapy is the mainstay of schistosomiasis control and is carried out largely through the use of praziquantel. This efficacy against adult worms of all schistosome species that infect human has led to its widespread use (Fenwick and Webster 2006). The widespread reliance on praziquantel for schistosomiasis control may hasten the selection of drug resistant parasites. The development of resistance to the conventional schistosomicidal drugs has justified the search for new compounds.

Several compounds has shown promise for schistosomiasis therapy, for example artemeter (Ulzinger et al., 2007), Protease inhibitors and 2-(alkylamino)-1-phenyl-1-ethanethiosulfuric acids (Abdulla et al., 2007; Moreira et al., 2007),

The schistomacide effect of imidazolidine derivative has been related since 1954, by Luttermoser e Bond that reported that 5,5-diphenylhydantoin and 5-(p-chlorophenyl)-5-methylhydantoin showed activity against *Schistosoma mansoni* infections in mice. Other studies confirmed the modest activity at toxic levels of 5,5-diphenylhydantoin and the 5-(2,4,5-Trichlorophenyl)hydantoin showed the potent schistosomicide effect (Werbel and Elslager, 1977).

At present, evaluate the schistosomacide properties of the derivate 3-benzyl-5-(4-chloro-arylazo)-4-tioxo-imidazolidin-2-one (LPSF/PT05) to showed the higher activity *in vitro* in adults male worms, with 100 % mortality after 24 hours of contact in all the concentrations (174, 116, 58 μ M). However, the adult female worms showed greatest effects with the concentrations of 58 and 116 μ M was after 96 and 72 hours respectively. The direct relationship between the concentration and the effect obtained in the period of 24 hours, and there is a dose dependent relationship. The derivate LPSF/PT05 caused alteration in the tegument surface of the worms with the formation of bubbles and peeling, indicating damage to cells, and effect directly related to the duration of exposure (Pitta et al., 2006).

This *in vitro* experiment for LSPF/PT05 on adult schistosomes confirmed the promising *in vivo* results. However, the compounds present a limitation in their use due to their poor solubility in water, it is the limitant factor. A strategy to overcome this inconvenience was the complexed the LPSF/PT05 using hydrophilic polymer PEG, that were solubilized in water. It was done three experiments with distint preparations, so was observed that the increases of solubility, increases the schistossomal effect.

According to literature, the drug is efficient for schistosomal activity when the reduction in the worms number is superior to 80% and low when values are under 30 % (Nwaka et al., 2006; Botros et al., 2004).

In the 200 mg/Kg praziquantel concentration administration for five consecutive days, produces a reduction in the worms number of 94 % (Botros et al., 2004). The complexed PEG with imidazolidinic derivative produces the reduction in the recovered worms number with statistical significance the approximately 50 % for total doses the 50 and 150 mg/kg and the concentration of 500 mg/kg the reduction in the worms number of 67,90%.

The experimental conditions similar in our laboratory observed the reduction in the worms number of 86,6 % in the concentration 125 mg/kg and in the concentrations 500 mg/ Kg the praziquantel the reduction was 100 %. The LPSF/PT05 is a very promissory prototype. The oogram pattern was kept because the residual charge of adult worms, so there is not interruption of stages eggs analyzed. Although, has been observed reductions in levels of mature eggs and impractical when compared to the control group.

Cellular immune response to *S. mansoni* has been intensively studied because of the granulomatous response and fibrosis during pathogenesis. The role of granulomas in schistosomiasis has been studied. Granuloma has a protective role by sequestering hepatotoxins secreted from eggs (Phillips and Colley, 1978); however, is also a cell-mediated inflammatory response responsible for the pathology that result in periportal fibrosis (Phillips and Lammie, 1986; Lukacs et al., 1994). The immune response in *S. mansoni* infection has been shown to be a T-cell dependent mechanism, where the host has initially a Th1 response against the early stages of the parasite (Lukacs and Boros, 1992). After eggs deposition, increases Th2 response with IL-4 and IL-5 production

(Grzych et al, 1991). The balance of Th1 and Th2 cytokines are determinant in the regulation do pathology and formation of granuloma and hepatic fibrosis. In murine models of *S. mansoni* infection, a well-defined Th subset dichotomy has been reported in which T helper 1 (Th1) produces IFN γ and tumor TNF- α , which activate macrophages as part of a delayed type hypersensitivity reaction. The reaction was reported to provide protection against *S. mansoni* infection in mice (Sher, 1992).

The present study has described the effects of treatment with LPSF/PT05 in solid dispersion with PEG on the production of cytokines in response to SEA, ConA and unstimulated cells from mice infected with *S. mansoni*. We found no significant differences on IFN γ , IL-4, IL-10 production in response to specific antigen SEA. However, IFN γ productions of mitogen-stimulated cells were suppressed in dose dependent mechanism with 10, 30 and 100 mg/Kg. That's possible that this drug has a potencial suppressor effect over lymphocyte response.

It was demonstrated that N1-mono and N1, N2-disubstituted imidazolidin-2-one has a significant immunosuppressive activity similar that is observed with obtained with cyclosporin A with maximal inhibition of proliferation of ConA stimulated splenocytes.(Sabourin et. al, 2004)

We will further investigate the properties of our molecule, however, as an imidazolidinic derivates; it's possible that the suppression of IFN γ observed could be by suppression on T cell proliferation.

On the other hand, surprisingly, the basal IFN γ production of treated animals was strongly stimulated in dose dependent mechanism. We believed that somehow innate mechanisms were activated, and this IFN γ production maybe is independent of T cell activation. In the future we should investigate if this IFN γ has being produced by APC cells and/or NK cells activated by LPSF/PT05 in solid dispersion with PEG.

Mitogen-stimulated cells with maximal dose of 100mg/Kg suppressed IL-4 production. At this higher dose we found a lower stimulation of basal IFN γ production and also inhibition of mitogen stimulated IFN γ . The effect of the drug both to Th1 and Th2 cells could be responsible for the better result of the treatment.

In the histopatological study of *Schistosoma mansoni* infection, the eggs swept into the liver elicit T-cell dependent responses leading to macrophage activation and granuloma formation around them (Davis et al., 1974). The severity of the disease is determined by the extent of granuloma formation and eggs deposited in the tissues. An important feature of murine schistosomiasis mansoni is granuloma immunomodulation, i.e. the spontaneous down-regulation of the response to newly deposited eggs with increased duration of infection (Domingo and Warren 1968; Olds and Stavitsky 1986). Immunomodulation has been linked to a decrease of T cell responses to egg antigens and is beneficial to the host in that it limits tissue injury and morbidity (Hurst et al., 2006).

Ours histopathological analysis is consistent with the results observed during study of immunologic evaluation. The immunosuppressive activity suggested by ours immunological observations was refforced by the morphological aspects of hepatic parenchyma of mice infected and treated with the dispersion in solid PEG containing 10 % of LPSF/PT05 with 100 mg/Kg where the involucional granuloma stages limits tissue injury, however in lower doses (3, 10 and 30 mg/Kg) this effect was observed in smaller proportion. This histopatological findings were not compatible with the data already described by other authors that reported a commitment of liver like the Symmers fibrosis (Raso, 2000).

The decrease of the exudative-productive hepatic granuloma stages was observed for all doses, mainly at 100 mg/Kg and its can be related with low production

of the IL4 and consequently with increases Th2 response. Intriguingly, histological examinations of intestine revealed that the animals treated with 3 mg/Kg (LPSF/PT05-PEG) demonstrated a significant increase of the number of involutinal granuloma stages, when compared with the parenchyma hepatic, probably associated with biological variations.

Theses results (parasitological, immunological and histopatological) together pointed the dose of 100 mg/Kg (LPSF/PT05-PEG) as a potential candidate on schistosomiasis treatment. At this dose we found effect over the worms and an attenuation of granuloma formation. The derivate imidazolidinic may have a role in granuloma involution, possibly via suppression of immunological activity.

Acknowledgement

This work was supported by grants from Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- Abdulla, M.H., Lim, K.C., Sajid, M., McKerrow, J.H., Caffrey, C.R., 2007. Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. *PLoS Med.* 4, e14.
- Albuquerque, M.C.P.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., 2005. Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioxo-imidazolidine compounds. *Pharmazie.* 60, 13-17.
- Benazet, F.; Leroy, J.P., 1974. Activité de la (nitro-5 thiazolyl-2)-I imidazolidine thione-2 (26354 R.P.) sur la bilharziose expérimentale des animaux de laboratoire. *Bull. Soc. Pat. E.* 3, 287-297.
- Blanchard, T.J., 2004. Schistosomiasis. *Travel Med. Infect. Dis.* 2, 5–11.
- Brooker S, Utzinger J. Integrated disease mapping in a polyparasitic world. *Geospatial Health* 2007; 1:141–146.

Botros, S., William, S., Ebeid, F., Cioli, D., Katz, N., Day, T.A., Bennet, J.L., 2004. Lack of evidence for an antischistosomal activity of myrrh in experimental animals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 71, 2, 206-210.

Chen, M.G., 2005. Use of praziquantel for clinical treatment and morbidity control of Schistosomiasis japonica in China: a review of 30 years experience. *Acta Trop.* 96, 168-176.

Costa-Silva, M., Rodrigues-Silva, R., Hulstijn, M., Neves, R.H., De Souza Panasco, M., Lenzi, H.L., Machado-Silva, J.R., 2002. Natural *Schistosoma mansoni* infection in *Nectomys squamipes*: histopathological and morphometric analysis in comparison to experimentally infected *N.squamipes* and C3H/He mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 97, 129-142.

Davis, B.H., Mahmoud, A.A.F., Warren, K.S., 1974. Granulomatous hypersensitivity to *Schistosoma mansoni* eggs in thymectomized and bursectomized chickens. *J. Immunol.* 113, 1064–1067.

Domingo, E.O., Warren, K. S., 1968. Endogenous desensitization: changing host granulomatous response to schistosome eggs at different stages of infection with *Schistosoma mansoni*. *Am. J. Pathol.* 52, 369-379.

Engels, Chitsulo, D.L., Montresor, A., Savioli, L., 2002. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Trop.* 82, 139–146.

Farley, J. 1991, *Bilharzia: A History of Imperial Tropical Medicine*, Cambridge University Press, UK, Cambridge, 249-266.

Ferrari, T.C.A., 1999. Spinal cord schistosomiasis: a report of 2 cases and review emphasizing clinical aspects. *Medicine* 78, 176-190.

Fenwick A., Savioli, L., Engels, D., Robert, B.N., Todd, M. H. 2003. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. *Trends Parasitol.* 19: 509-515.

Fenwick, A., Webster, J.P., 2006. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19, 577–582.

Fenwick A. 2006, Waterborne infectious diseases: could they be consigned to history? *Science*; 313:1077–1081.

Grzych, J. M., E. Pearce, A. Cheever, Z. A. Caulada, P. Caspar, S. Heiny, F. Lewis, A. Sher. 1991. Egg deposition is the major stimulus for the production of Th2 cytokines in murine schistosomiasis mansoni. *J. Immunol.* 146:1322.

Henze, H.R.; Smith, P.E., 1943. Direct replacement of oxygen in hydantoins and barbiturates by sulfur. *J. Am. Chem. Soc.* 65, 1090-1092.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A., 2006. Incorporating a rapid-impact package for neglected tropical diseases with programs for HIV/AIDS, tuberculosis, and malaria. PLoS Med 2006; 3:e102.

Hurst, M. H., Lola, S.G., Lindberg, R., 2006, Immunomodulation of the hepatic egg granuloma in *Schistosoma japonicum*-infected pigs. Parasite Immunology. 28, 681-686.

Jones, G.L., Woodbury, D.M., 1982. Drug Dev. Res., 2, 333-355. In: Cortes, S.; Liao, Z.K.; Watson, D.; Kohn, H. (1985) Effect of structural modification of the hydantoin ring on anticonvulsant activity. J. Med. Chem. 28. 601-606.

Kiernan, J., 1999. Histological and histochemical methods Butterworth Heinemann, Oxford.

King, C.H., Dickman, K., Tisch, D.J., 2005. Reassessment of the cost of chronic helminthic infection: a meta-analysis of disability-related outcomes in endemic schistosomiasis. Lancet 365, 1561–1569.

Lukacs, N. W., D. L. Boros., 1992. Utilization of fractionated soluble egg antigens reveals selectively modulated granulomatous and lymphokine responses during murine schistosomiasis mansoni. Infect. Immun. 60, 3209.

Lukacs, N. W., S. W. Chensue, R. M. Strieter, K. Warmington, S. L. Kunkel., 1994. Inflammatory granuloma formation is mediated by TNF-alpha-inducible intercellular adhesion molecule-1. J. Immunol. 152, 5883.

Luttermoser, G.W., Bond, H.W.J. Parasitol., 40, 33, 1954. In: Werbel, L.M., Elslager, E.F., 1977. Antischistosomal effect of 5-(2,4,5,-trichlorophenyl)-hydantoin and related compounds. J. Med. Chem. 20, 12, 1569-1572.

McManus, D. P. (2000) A vaccine against Asian schistosomiasis: the story unfolds. International Journal for Parasitology 30, 265-271.

Mcmanus, D. P., dalton, J.P. (2006) Vaccines against the zoonotic trematodes *Schistosoma japonicum*, *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. Parasitology 133, S43–S61.

Marton, J.; Enisz, J; Hosztafi, S.; Tímár, T., 1993 Preparation and fungicidal activity of 5-substituted hydantoins and their 2-thio analogs. J. Agric. Food Chem., 41, 1, 148-152.

Moreira, L.S., Pilo'-Veloso, D., de Mello, R.T., Coelho, P.M., Nelson, D.L., 2007. A study of the activity of 2-(alkylamino)-1-phenyl-1-ethanethiosulfuric acids against infection by *Schistosoma mansoni* in a murine model. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 101, 385–390.

Nwaka, S., Hudson, A., 2006. Innovative lead discovery strategies for tropical diseases Nature Reviews Drug Discovery | AOP, published online 13 October; doi:10.1038/nrd2144.

Olds, G. R., Stavitsky, A. B., 1986. Mechanisms of *in vivo* modulation of granulomatous inflammation in murine schistosomiasis japonicum. Infect. Immun. 52, 513-518.

Olds, G.R. Dasarathy S. 2000. Schistosomiasis. Curr Treat Options Infect Dis. 2: 88-99.

Oliveira S.M., Albuquerque, M.C.P.A., Pitta, M.G.R., Malagueño E., Santana J.V., Lima, M.C.A., Pitta, IR, Galdino SL, 2004. A resposta do *Schistosoma mansoni* mantido *in vitro* frente a derivados imidazolidinônicos. Acta Farm Bonaerense 23:343-348.

Oliver, L., Stirewalt, M.A. 1952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. J. Parasitol. 38, 19-23.

Pellegrino, J., Faria, J., 1965. The oograma method for the screening of drugs in *S. mansoni*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 14: 363-369.

Phillips, S. M., D. G. Colley. 1978. Immunologic aspects of host responses to schistosomiasis: resistance, immunopathology, and eosinophil involvement. Prog. Allergy 24:49

Phillips, S. M., P. J. Lammie., 1986. Immunopathology of granuloma formation and fibrosis in schistosomiasis. Parasitol. Today. 2:296.

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. 2006. New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 101 (Supl. I) .313-316.

Raso, P. 2000. Esquistossomose mansonica. In: G. Brasileiro Filho, Patologia, 6ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 1186-1207.

Sabourin C, Robert JM, Robert-Piessard S, Carbonnelle D, Lang F., 2004. Synthesis and evaluation of disubstituted N1- and N3-imidazolidin-2-ones acting as potential immunosuppressive agents. J Enzyme Inhib Med Chem, 19(6):459-65.

Sher A, James S, Correa-Oliveira R, Hieny S, Pearce E., 1992. Schistosome vaccines: current progress and future prospects. Parasitol. 98:S61–S68.

Soliman, R.; Feid-Allah, H.M.; Mohamed, H.F., 1981. Preparation and antidiabetic activity of cyclic sulfonylthiourea derivatives. J. Pharm. Sci. 70, 952-956,. In: Rossi, M.H.; Zelnik, R. 2000, Contribuição à química das imidazolidinadionas - Síntese de ciclanilideno-hidantoínas. Arquivos do Instituto Biológico, 67,1.

Steinmann P, Keiser J, Bos R, Tanner M, Utzinger J., 2006. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. Lancet Infect Dis, 6:411-425.

Utzinger, J., Keiser, J., Xiao, S.H., Tanner, M., Singer, B.H., 2003. Combination chemotherapy of schistosomiasis in laboratory studies and clinical trials. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 1487–1495.

Utzinger J, Keiser J. 2004. Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. *Expert Opin Pharmacother*; 5:263–285.

Utzinger, J., Xiao, S.H., Tanner, M.; Keiser, J., 2007. Artemisinin for schistosomiasis and beyond. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 8, 105–116.

Van der Werf, M. J., De Vlas, S. J., Brooker, S. 2003. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Tropica*, 86: 125-139.

Xiao-Nong, Z., Li-Ying, W., Ming-Gang, C., Wu Hua, X., Qing-Wu, J., Xian-Yi, C., Jian, Z., Utzinger, J., (2005) The public health significance and control of schistosomiasis in China—then and now. *Acta Tropica* 96, 97–105.

Ware, E. 1950. The chemistry of hydantoins. *Chemical Reviews*, 46, 403-470.

Werbel, L.M.; Elslager, E.F. 1977, Antischistosomal effects of 5-(2,4,5-trichlorophenyl) hydantoin and related compounds. *J. Med. Chem.*, 20, 12, 1569-1572.

WHO, 1999. Report of the WHO informal consultation on schistosomiasis control. WHO/CDS/CPC/SIP/99.2. WHO, Geneva.

WHO, 2002. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: report of a WHO expert committee. WHO Tech. Rep. Ser. No. 912. World Health Organization, Geneva

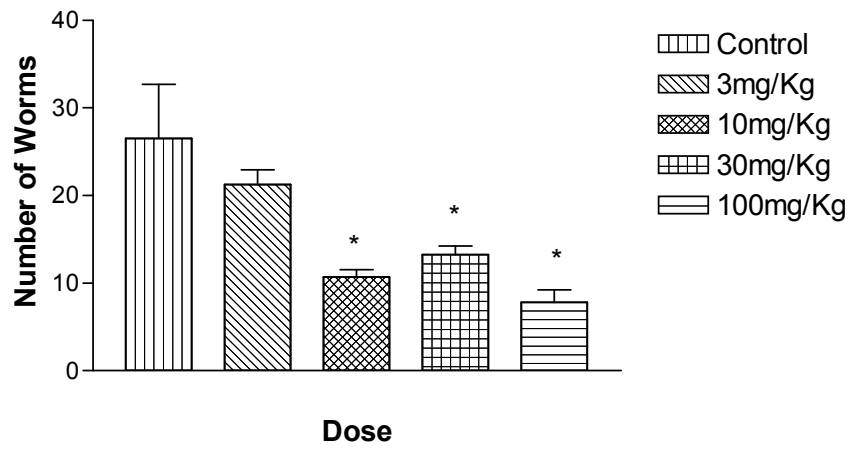


Fig. 1. Reduction in the number of adult worms of *S. mansoni* through dispersion of solid containing 10 % of LPSF/PT05 in PEG.

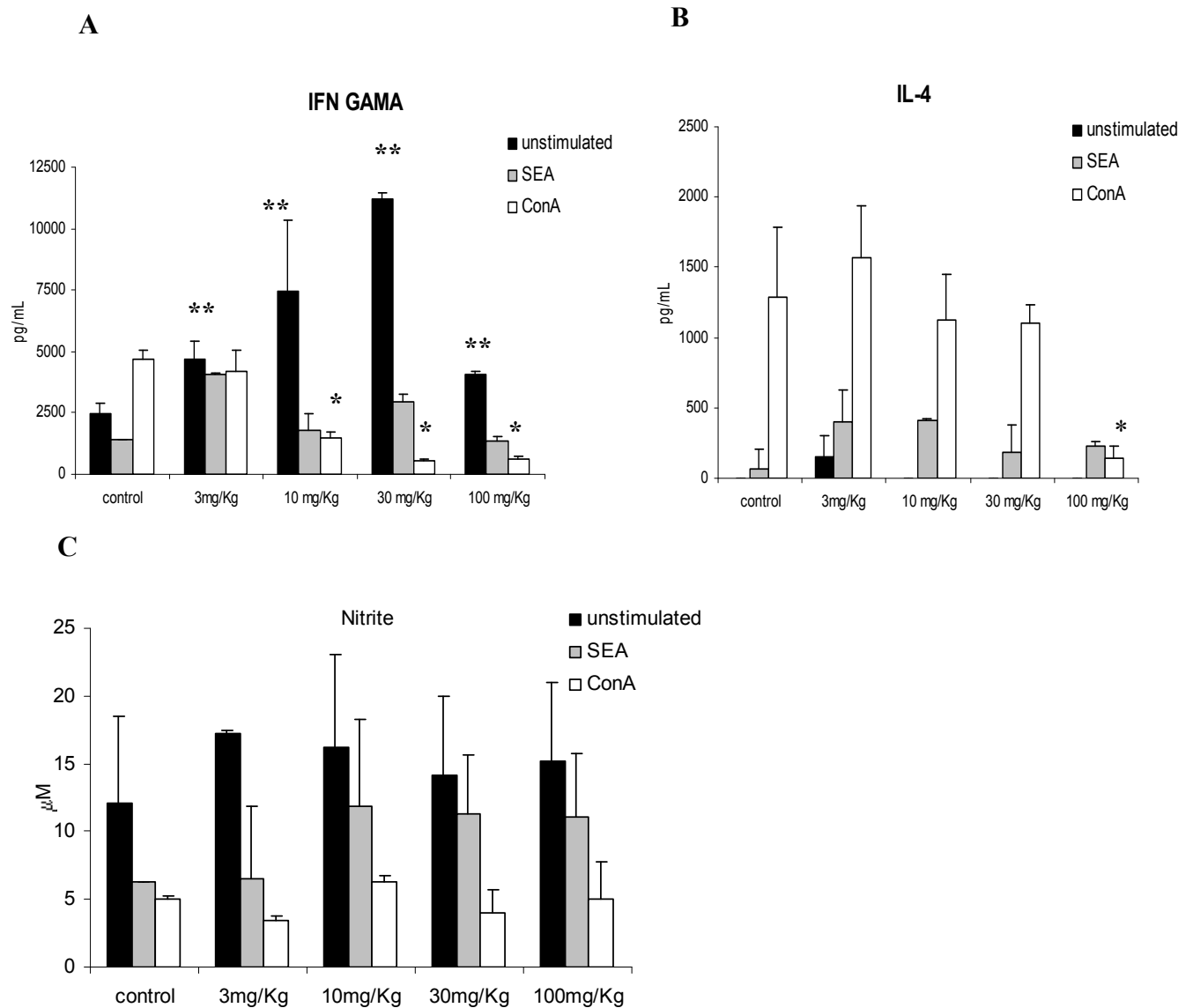


Fig. 2. IFN γ (a) and IL4 (b) production by *S. mansoni* infected mice treated with LPSF-PT5 or untreated. The spleen cells were obtained from 60 days infected mice (treated or not) and cultured for 72h before harvesting the supernatants for cytokine determination by ELISA and nitrite production. (c) Nitric Oxide production detected by nitrite accumulation determinate by Griess method. Arithmetic means + SD of duplicate experiments: * lower than control $p < 0.05$. ** higher than control $p < 0.05$.

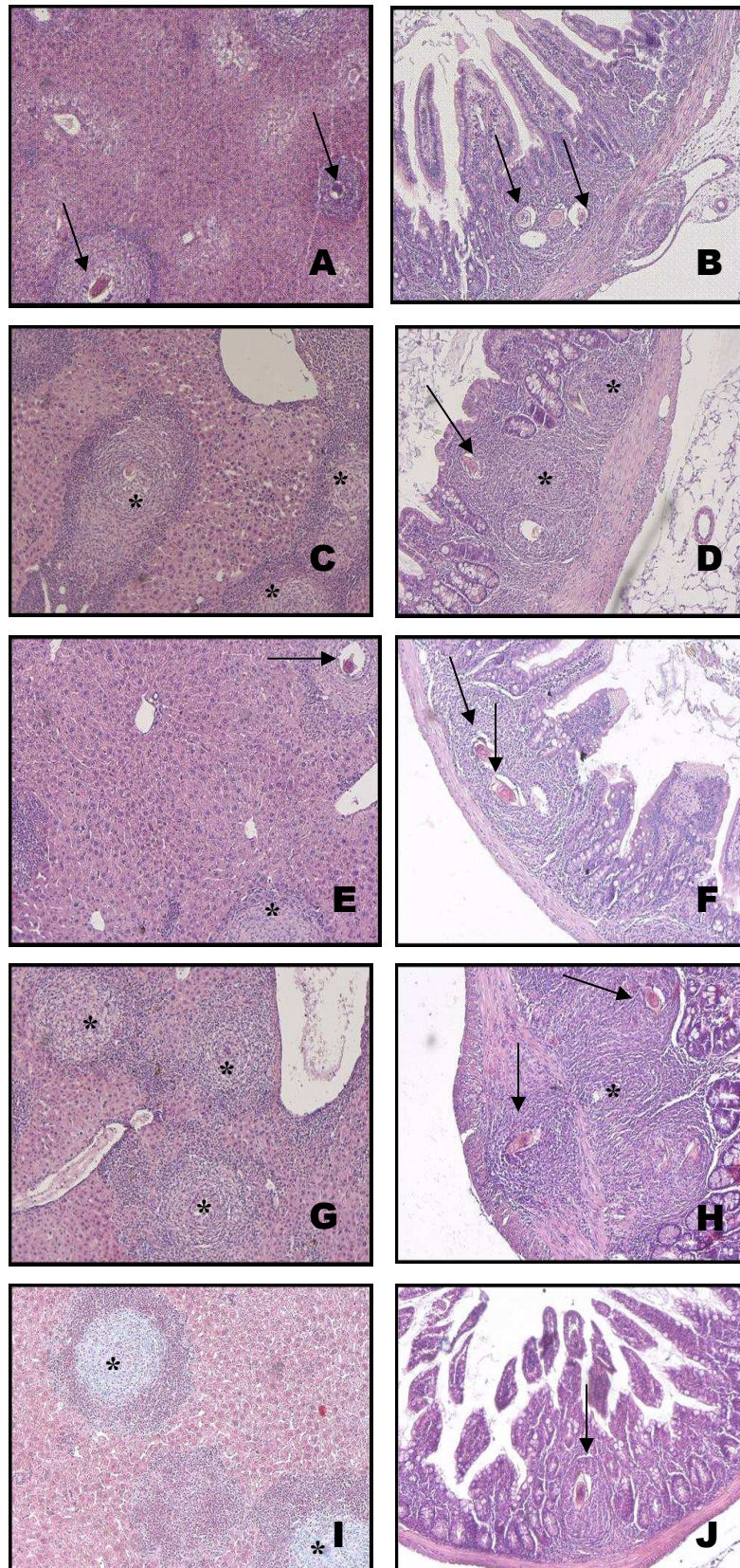


Fig. 3. Photomicrographs of granulomatous stages in livers and intestines (respectively) of mice infected by *S. mansoni*. **a** and **b**) infected controls, exhibiting exudative-productive stage granuloma (arrows) with a mature, viable egg in the centre of the fibrocellular granulomas (liver) and presence of viable eggs (arrows) detected in submucosa and serosa layers (intestine). **c** and **d**) LPSF/PT05 (3 mg/Kg per day), showing well circumscribed small fibrocellular granuloma and marked ova degeneration (asterisk) in the

liver and we noted productive and involutinal stage granulomas (asterisk) in submucosa layers (intestine). **e** and **f**) LPSF/PT05 (10 mg/Kg per day), productive (arrow) and involutinal (asterisk) stage granulomas were found in liver and viable eggs (arrow) were detected in submucosa. **g** and **h**) LPSF/PT05 (30 mg/Kg per day), involutinal stage granulomas (asterisk) were found in liver and viable eggs (arrows) were detected in submucosa and muscular layers. **i** and **j**) LPFS/PT05 (100 mg/Kg per day) involutinal stage granulomas (asterisk) were found in liver and viable eggs (arrows) were detected only in submucosa layers. H&E and Masson' trichrome, micrographs are at 100x magnification.

Table 1

Average of hepatic granuloma numbers of mice infected by *S.mansoni* and treated with LPSF/PT05-PEG

Number of hepatic granulomas of mice infected by <i>S.mansoni</i> and treated with LPSF/PT05-PEG					
Granuloma stages	control	3mg/Kg	10mg/Kg	30mg/Kg	100mg/Kg
Exudative-productive	22.33 ± 4.16*	15.66 ± 8.50	8.00 ± 1.70* [#]	20.66 ± 5.80 [#] •	11.00 ± 1.00*•
Involutinal	32.33 ± 12.50	43.33 ± 16.20	20.66 ± 7.76 [♦]	44.00 ± 11.35 [♦]	29.66 ± 9.29

Animals per groups (n=3). The values are expressed in Means ± SD. Comparisons were made by Student's *t*-test and values represent means ± SEM ($p \leq 0.05$)

Table 2

Average of intestine granuloma numbers of mice infected by *S.mansoni* and treated with LPSF/PT05-PEG

Number of intestine granulomas of mice infected by <i>S.mansoni</i> and treated with LPSF/PT05-PEG					
Granuloma stages	control	3mg/Kg	10mg/Kg	30mg/Kg	100mg/Kg
Exudative-productive	3.75 ± 2.50	3.75 ± 2.98	2.00 ± 1.15	4.25 ± 3.30	2.50 ± 1.91
Involutinal	1.50 ± 1.00 [#]	4.25 ± 1.50 [#] *	2.50 ± 3.00	2.00 ± 2.44	0.75 ± 0.95*

Animals per groups (n=4). The values are expressed in Means ± SD. Comparisons were made by Student's *t*-test and values represent means ± SEM ($p \leq 0.05$).

PRAZIQUANTEL: Usos e Associações

**A ser submetido à Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas
ISSN: 1516-9332
BRASIL**

Praziquantel: usos e associações

Andréa Cristina Apolinário da Silva¹, Maria do Carmo Alves de Lima¹, Suely Lins Galdino¹, Ivan da Rocha Pitta¹, Mônica Camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque²

¹ Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, CEP 50670-901,
Recife, Pernambuco, Brasil

² Departamento de Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, CEP
50670-901, Recife, Pernambuco, Brasil

² Laboratório de Imunologia Keizo Asami – LIKA-UFPE

* Corresponding author: Profa. Dra. Mônica camelo Pessoa de Azevedo Albuquerque. e-mail:
jcmonica@globo.com

Resumo

O praziquantel é um fármaco que se encontra no mercado desde os anos de 1970. Com aplicação contra helmintos, especificamente cestodas e trematodas. Atualmente, é o único fármaco disponível contra todas as espécies de *Schistosoma*. Apresenta toxicidade baixa, não sendo observado mutagenicidade nem citotoxicidade. O praziquantel vem sendo associado a fármacos com o objetivo de evitar uma maior exposição e consequentemente, o surgimento de cepas resistentes ao mesmo. A possibilidade de resistência de cepas de *Schistosoma* ao praziquantel tem sido relatada no Egito e Senegal, fato que requer um monitoramento freqüente da sua utilização, sobretudo pelo constante aumento de demanda na região Africana, a qual responde por 85% da prevalência da esquistossomose no Mundo. Esta delicada situação chama a atenção ao uso responsável do praziquantel fazendo-se necessário o conhecimento sobre este fármaco que representa a única ferramenta de controle da Esquistossomose.

UNITERMOS: Praziquantel, Antihelmíntico, Esquistossomicida, Cestocida, Resistência ao Praziquantel

INTRODUÇÃO

A descoberta do praziquantel (PZQ) nos anos 1970 trouxe para a terapia da esquistossomose a disponibilidade de uma droga efetiva, segura e de fácil administração, além de apresentar atividade sobre todas as espécies de *Schistosoma* (Cioli e Picca-Mattoccia 2003). Com o sucesso terapêutico alcançado, as medidas de controle da esquistossomose as quais eram anteriormente voltadas, sobretudo para o combate ao caramujo, através de moluscidas químicos, passaram por recomendação do comitê da OMS (Organização Mundial de Saúde) a ter a quimioterapia, através do PZQ como a principal ferramenta de controle dessa parasitose (WHO, 2002). Desde então, o PZQ vem sendo responsável pelo controle da morbidade causada pela esquistossomose em países como China, Egito, Filipinas e Brasil. Atualmente, o desafio está em controlar a esquistossomose nos países da África sub-Saariana, região que responde com aproximadamente 85% da prevalência mundial da esquistossomose e cuja disponibilidade de uso do PZQ corresponde a somente 3% (Fenwick, 2003). Inúmeras iniciativas tem sido adotadas por órgãos como a UNESCO, UNICEF, WHO, World BANK, Fundação Bill and Melinda Gates, com objetivos de melhorar a saúde da população com base sobretudo no acesso aos antihelmínticos (Fenwick, 2003). Desta forma, a demanda do PZQ vem aumentando cada vez mais não somente como fármaco esquistossomicida, mas como fármaco de ação sobre várias espécies de parasitos platelmintos. A indisponibilidade de outro medicamento para tratamento da esquistossomose sinaliza que o uso do PZQ deve ser monitorado a fim de se evitar o desenvolvimento de cepas de *Schistosoma* praziquantel-resistentes. Diante deste contexto, reunimos nesta revisão, novas propostas que contribuem para a elucidação do seu mecanismo de ação, usos de adjuvantes e associações medicamentosas que incrementam seu potencial terapêutico e seu espectro de atuação como fármaco antihelmíntico.

A descoberta do praziquantel, quimicamente o 2-ciclo-hexil-carbonil-1,2,3,6,7,11b-hexaidro-4*H*-pirazino-[2,1-*a*]-isoquinolina-4-ona (Figura 1), se deu a partir de um acordo entre as empresas Merck e Bayer no início da década de 70 no século passado. Naquela época a Merck cedeu a Bayer uma série de compostos, a princípio investigados quanto às propriedades anticonvulsivantes, para serem avaliados quanto à atividade esquistossomicida. A molécula do Praziquantel foi patenteada pela Merck & Co. Inc., mas sua propriedade esquistossomicida foi primeiro descoberta e

comercializada pela Bayer com o nome comercial de Biltricide para uso em humanos e Droncit para uso veterinário.

INSERIR FIGURA 1

Atualmente, outras indústrias farmacêuticas também produzem e comercializam o PZQ como a Shin Poong e a Jian An Pharmaceutical Company (Fenwick et al, 2003) com uma vasta variedade de nomes no mercado mundial (Cioli e Picca-Mattoccia, 2003) Tabela 1. A ampla produção genérica do praziquantel requer atualmente avaliações sistemáticas dos padrões farmacopéicos no que diz respeito à análise quantitativa do princípio ativo, pureza, desintegração e dissolução visando garantir a qualidade da produção e desta forma excluir a possibilidade de desenvolvimento de resistência dos parasitos ao fármaco por uso de medicamento farmacotecnicamente inadequado (Doenhoff, Kimani e Cioli 2000; Appleton e Mbaye 2001; Sulaiman, et al., 2002).

INSERIR TABELA 1

O praziquantel vendido comercialmente é uma preparação de composição racêmica composta por partes iguais de isômeros “levo” R(-) e “dextro”S(+). Porém apenas o (-)-enantiômero é dotado de atividade esquistossomicida, como foi revelado em testes *in vitro* e *in vivo* (Andrews et al., 1983; Liu et al., 1986; Xiao e Catto 1989; Wu et al., 1991). Os dois isômeros apresentam a mesma toxicidade (Liu et al., 1986). Wu e colaboradores em 1991 observaram que pacientes com esquistossomose tratados com 20 mg/kg do (-)-praziquantel apresentaram a mesma taxa de cura, porém com menos efeito colateral do que aqueles tratados com 40 mg/kg de uma mistura racêmica. Devido à economia do produto, e a incerteza dos efeitos colaterais em longo prazo desta mistura racêmica associada à administração em larga escala, é necessário o desenvolvimento de uma rota de síntese enantioseletiva para este derivado isoquinolina (Roszkowski et al, 2006). Embora seja viável e necessária uma rota seletiva para a síntese do (-)-praziquantel, apenas Zhang e colaboradores em 2004, apresentaram uma contribuição neste campo.

Mecanismo de ação do praziquantel

O praziquantel é o fármaco de escolha no tratamento dos platelmintos. O mecanismo de ação do praziquantel ainda não está bem explicado, pois o modo de ação

a nível celular e molecular não foi compreendido totalmente (Jeziorski e Greenberg 2006). O praziquantel possui eficácia seletivamente tóxica contra *Schistosoma* e o mecanismo de ação sobre este parasito tem sido bastante estudado (Andrews et al., 1983; Harneet 1988) muito mais do que com relação ao mecanismo de ação contra os cestodas e outros trematodas (Martin 1997).

Sobre vermes adultos de *Schistosoma* o praziquantel manifesta efeitos bem definidos quando avaliado *in vitro*: primeiro se observa uma rápida contração na musculatura (Pax, Bennett e Fetterer 1978). Imediatamente, cessam-se os movimentos e o corpo do parasito adquire a aparência típica de uma banana (Pica-Mattoccia e Cioli 2004). Este efeito está relacionado ao aumento da entrada de cálcio no parasito (Wolde-Mussie 1982). Segundo Mehlhorn e colaboradores (1981) o praziquantel aumenta o influxo de cálcio pelo tegumento do *Schistosoma* e causa uma rápida contração do verme. Em meio livre de cálcio ocorre o bloqueio da contração produzida pelo praziquantel (Wolde-Mussie 1982; Fetterer, Pax e Bennett 1980; Thompson, Pax e Bennett 1984). O efeito do praziquantel no influxo do cálcio sugere que os sítios de ação são os canais de íons permeáveis ao cálcio, na membrana do tegumento e nas células musculares do parasito (Blair, Bennett e Pax 1994).

Recentes evidências apontam para o canal de cálcio dependente de voltagem como um possível alvo para o fármaco, baseado nas características estruturais e funcionais das subunidades β destes canais (Greenberg 2005). Os canais de cálcio dependente de voltagem pertencem a uma superfamília de canais iônicos dependentes de voltagem que responde a uma mudança no potencial de membrana por permitir seletivamente a entrada de íons a partir de um gradiente eletroquímico. Os canais de cálcio dependentes de voltagem possuem um único papel dentro desta família por associar mudanças no potencial de membrana devido ao influxo de cálcio necessário para obter sinalização intracelular (Catterall 2000; Hofmann, Lacinova e Klugbauer 1999). Estes canais são formados por subunidades. Destas a subunidade α_1 seria aquela responsável pela formação do poro (entrada) e outras subunidades auxiliares bem menores e conhecidas como β , $\alpha_2\delta$ e γ . Embora a subunidade α_1 seja quem determina a ação farmacológica do canal e a natureza da corrente de voltagem, as subunidades auxiliares possuem um importante papel na forma da resposta do canal. A subunidade α_1 contém quatro domínios homólogos conectados por voltas intracelulares, que forma o local do poro na membrana (Doyle et al., 1998) cada domínio inclui seis segmentos transmembrana (S1-S6), onde no resíduo S4 há o resíduo positivo que atua como um

sensor de voltagem e a loop extracelular entre S5 e o S6 determina a seletividade do íon do canal (Jeziorski e Greenberg 2006).

Estes canais de cálcio dependente de voltagem podem ser divididos em canais ativado por alta voltagem e canais ativados por baixa voltagem, definido por um potencial de membrana que abre o canal. O canal de cálcio ativado por alta voltagem vem dividindo as bases da resposta farmacológica. Enquanto que os canais de cálcio ativados por baixa voltagem são sensíveis aos bloqueadores de canais de cálcio clássicos como a nifedipina, verapamil e diltiazem (Jeziorski e Greenberg 2006).

Três diferentes subunidades α_1 dos canais de cálcio foram clonadas a partir do *Schistosoma mansoni* (Kohn et al., 2001). Baseada na similaridade seqüencial das bases duas dessas aparentaram ser subunidade Ca_v2 do tipo não longa duração (Ca_v2 tipo Não-L), esses canais são sensíveis a toxinas peptídicas das aranhas e caramujos marinhos. Enquanto que a terceira é do tipo Ca_v1 de longa duração (Ca_v1 tipo L), sendo sensível aos bloqueadores de canais orgânicos, como os grupos químicos dos benzodiazepínicos (Pica-Mattoccia et al., 2007). Essas informações confirmam que o Ca_v1 Tipo L está envolvido na atividade do praziquantel em *Schistosoma*, porque tanto a nicardipina como a nifedipina exercem apenas uma inibição parcial sobre o efeito do praziquantel, sendo explicado por uma ligação fraca na subunidade $\alpha-1$ (Pica-Mattoccia et al., 2007). Outro efeito do praziquantel diz respeito a sua capacidade de promover lesão da superfície do tegumento com exposição dos antígenos do parasito incluindo a actina (Bicker et al., 1983; Harneet 1988; Linder e Thors 1992; Lima et al., 1994). O praziquantel liga-se com a actina provavelmente provocando uma mudança na conformação da molécula, com conseqüências dramáticas na função e ligação proteína-actina, resultando em uma grave alteração na fisiologia e na integridade do tegumento do parasito (Linder e Thors 1992). Como conseqüência da lesão tegumentar, estabelece-se a ligação e penetração de células do sistema imune do hospedeiro dentro do parasito. (Harneet e Kusel 1986; Brindley e Sher 1987). O sistema imune do hospedeiro tem, portanto um papel participativo na morte do parasito induzida pelo praziquantel.

A explicação para a exposição dos antígenos parasitários em função da lesão da superfície do tegumento pode ser devido a um aumento do cálcio no citosol levando a ativação da fosfolipase C e em seguida da proteína quinase C (Berridge e Irvine 1984; Sigiya e Furuyama 1990). A fosforilação da proteína pela proteína quinase C pode desestabilizar o tegumento causando uma vacuolização observada, e a exposição dos antígenos (Wiest et al., 1992).

A correlação entre a integridade do citoesqueleto de actina e a função dos canais de cálcio têm sido revelado em uma variedade de sistemas (Furukawa, Smith-Swintosky e Mattson 1995; Lader, Kwiatkowski e Cantiello 1999; Nakamura et al., 2000; Rueckschloss e Isenberg 2001). Pica-Mattoccia e colaboradores em 2006, também verificaram esta correlação usando uma substância que despolimeriza o citoesqueleto de actina, a Citochalasina D (CyD). Quando o *Schistosoma* é pré-tratado com concentrado de CyD, observa-se uma supressão drástica e completa dos efeitos letais do praziquantel indicando uma ruptura no citoesqueleto da actina e bloqueio da função dos canais de cálcio.

Uso de adjuvantes para incremento de sua atividade

A associação do praziquantel a adjuvante melhora seu efeito terapêutico. As associações são variadas, podendo aumentar a solubilidade do fármaco, ou agir por outros mecanismos de forma sinérgica com o praziquantel.

Uma forma de administração do praziquantel sugerida por Choi e colaboradores em 2006 seria a forma de liberação controlada. Essa forma é sugerida devido a observações no tratamento de clonorchíases, causado pelo *Clonorchis sinensis*, apresentando dificuldades de adesão ao tratamento, pois o intervalo de administração do praziquantel é de 5 horas, fato essencial para a cura. Geralmente a segunda e a terceira dose são esquecidas, resultando em uma cura incompleta (Hong et al., 2001). O praziquantel de liberação controlada é incorporado a uma base de alta viscosidade o hidroxipropil metilcelulose (HPMC), que leva a essa formulação uma dissolução de 10 horas (Hong et al., 2003).

Outro sistema de liberação controlada para o praziquantel foi sugerido por Jesus e colaboradores em 2006 (Jesus et al., 2006), onde encapsula o praziquantel com o β -ciclodextrina (β -CD), que é um oligossacarídeo cíclico composto por unidades de α -(1,4) glicosil, são produzidos a partir de amido ou de derivados da glicosil-ciclodextrina transferase, uma enzima bacteriana (Biwer et al., 2002). A inclusão complexa entre o praziquantel e a β -CD revelou um aumento de cinco vezes na solubilidade do praziquantel na água, contribuindo para o aumento na atividade farmacológica.

Peptídeos adamantilamida (AdDP), uma substância imunomoduladora sintética oriunda do grupo de peptídeos desmuramil com efeitos colaterais fracos (Masek et al., 1984), apresenta efeito hepatoprotetor, e estimulação humoral (Farghali et al., 1989;

Zidek et al., 1991). Quando associado com o praziquantel o AdDP apresenta bons resultados. O AdDP produz fraca estimulação na imunidade humoral e o praziquantel atua em sinergismo com a resposta imune. Devido a isso, Botros e colaboradores (2006), investigaram o uso do AdDP como adjuvante terapêutico com o praziquantel, em camundongos infectados com *S. mansoni* e observaram que houve um aumento na susceptibilidade do praziquantel em doses reduzidas. Neste trabalho o autor sugere que o AdDP pode intensificar a interação do anticorpo com os antígenos de superfície do parasito, levando a maiores danos no tegumento. Também ocorreu alteração na formação do granuloma em camundongo que recebeu essa combinação com diminuição significativa do diâmetro da percentagem de áreas fibróticas, com um aumento na percentagem de ovos degenerados. Por fim há uma sugestão de uso de coquetel de fármacos como alternativa para a esquistossomose (Botros et al., 2006).

Praziquantel e suas associações

As associações realizadas com o praziquantel visam potencializar o seu efeito ou prover maior cobertura terapêutica. Pesquisas desenvolvidas por Xiao e Catto (1989), evidenciaram a propriedade esquistossomicida do artemeter, fármaco usado na clínica médica para o tratamento da malária. A associação artemeter praziquantel é promissora, uma vez que o praziquantel atua apenas em vermes adultos do *S. mansoni* e do *S. haematobium*, enquanto que o artemeter atua nas fases jovens do parasito (Xiao et al., 2000; Utzinger et al., 2001).

A combinação do praziquantel com o albendazol pode ser uma alternativa no tratamento da neurocisticercose. Embora o albendazol venha apresentando maior eficácia do que o praziquantel há pacientes que persistem com o cisticerco vivo depois de repetidas doses de albendazol (Takayanagi 2004). Essa associação leva as alterações causadas por ações específicas de cada fármaco. O praziquantel altera o metabolismo do cálcio intracelular com o efeito principal de inibir movimentos musculares, enquanto que o albendazol afeta o dinamismo do tráfego vesicular, justificando assim o tratamento combinado induzir danos mais sérios e irreversíveis no parasito. Considerando que a toxicidade dos benzoimidazóis (albendazol) pode limitar a dose, o aumento na eficácia nesta combinação pode reduzir a dose e o tempo de tratamento (Palomares et al., 2006).

Na clínica veterinária, o praziquantel é utilizado em associação com oxantel e pirantel, conhecido comercialmente como Dolpac^R, Vetoquinol SA. Essa associação é usada no tratamento de nematodas e trematodas em cães. Grandemange e colaboradores (2006) testaram essa associação frente à *Toxocara canis*, *Ancylostoma caninum*, *Toxascara leonina*, *Trichuris vulpis*, *Uncinaria stenocephala*, *Taenia sp* e *Dipylidium caninum*, obtendo eficácia de 97-98 % frente a *Trichuris vulpis* e de 99 % para os demais parasitos, revelando ainda baixos efeitos colaterais (Grandemange et al., 2006). Outra associação encontrada na clínica veterinária é o milbemicina oxima com o praziquantel, para *Toxocara cati*, em gatos jovens e adultos com eficácia de 96% na redução do número de vermes. Essa associação também se encontra no mercado com o nome comercial de Milbemax, na concentração de 4 mg de milbemicina oxima, e 10 mg de praziquantel (Schenker et al., 2007).

No tratamento da giardíase em cães temos a associação do Febantel/ pirantel/ praziquantel (FPP) (Barr et al., 1998; Barutziki et al., 2001; Payne et al., 2002).

A associação do praziquantel com o triclabendazol é usada no tratamento de parasitos pancreáticos como o *Eurytrema pancreaticum* (Jiraungkoorskul et al., 2005), um parasito comum em herbívoros, mas que acidentalmente infecta o homem (Graydon et al., 1992; Ishii et al., 1983).

Espectro de ação do praziquantel

A principal atividade terapêutica em humanos do praziquantel é como fármaco esquistossomicida e tenicida atuando também contra outros parasitos do filo Platyhelminthes (Tabela 2), além de ser usado para tratar infecções por cestodas e trematodas em animais de importância econômica para humanos. Buscando entender esta seletividade contra membros desse filo, Greenberg (2005) sugere que o alvo molecular para o praziquantel, poderia ser codificado por um novo gene encontrado exclusivamente em platelmintos.

Desde seu surgimento o praziquantel se destacou como droga esquistossomicida, devido ao seu espectro de ação sobre todas as espécies de *Schistosoma* (Webbe e James 1977).

A Esquistossomose é uma das mais difundidas dentre todas as doenças parasitárias na África, Ásia, América do Sul e Caribe. Cinco espécies de *Schistosoma* infectam o homem: *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. mekongi* e

S. intercalatum. É adquirida através do contato com coleções aquáticas contendo moluscos infectados, os quais liberam as cercárias, forma infectante para o homem. A doença é endêmica em aproximadamente 74 países estima em cerca de 207 milhões de pessoas infectadas e 779 milhões em risco sendo 85% destes somente na África (Steinmann et al., 2006).

O praziquantel é bem tolerado e eficaz em pacientes de todas as idades, e em diferentes formas clínicas de esquistossomose, incluindo casos avançados de pacientes hepatoesplênicos (Bassily et al., 1985). Também na forma ectópica como a esquistossomose cerebral e síndromes neurológicas causadas por esquistossomose (Watt et al., 1986; Scrimgeour e Gajdusek 1985). E nas formas toxêmicas agudas conhecida como febre de Katayama (Monson 1987).

O praziquantel é ativo contra todas as espécies de *Schistosoma*, em doses de 40 – 60 mg/kg. Doses mais baixa são usadas para *S. mansoni* e *S. haematobium*, e doses mais elevada são usadas para *S. japonicum* e o *S. mekongi*, com taxas de cura variando de 75-90% (Doenhoff e Pica-Mattoccia 2006).

É efetivo sobre os estágios de cercárias e vermes adultos de *Schistosoma* (Ross et al 2002) e também apresenta atividade na fase intramolusco, interrompendo assim a produção de cercárias (Coles 1979; Touassem e Combes 1986; Yi e Combes 1987; Coelho et al., 1988; Riley e Chappell 1999; Mattos et al., 2006), mas não é ativo sobre os vermes imaturos, nestes a presença de organelas ácidas que funcionam de forma similar ao lisossoma, atuam como um depósito intracelular, permitindo ao parasito ficar livre do fármaco e assim não responder a ação do praziquantel (Carneiro-Santos et al., 2001; Al-Adhami et al., 2003, 2005).

O praziquantel é também o fármaco recomendado pela OMS para o tratamento da opistorquíase, parasitose causada por trematoda da família Opisthorchiidae tendo o *Opisthorchis viverrini*, *Opisthorchis felinus* e *Clonorchis sinensis* as espécies responsáveis por sérios problemas de saúde pública em muitas partes do leste europeu e no oriente e sudeste da Ásia. A Tailândia é uma área endêmica para a opistorquíase, com um número estimado de seis milhões de pessoas infectadas principalmente pelo *O. viverrini*. Na China são registrados aproximadamente 15 milhões de pessoas infectadas pelo *C. sinensis* (Lun et al., 2005). O hospedeiro definitivo infecta-se ao comer peixes crus ou mal cozidos, conforme é hábito nos países asiáticos. Os parasitos habitam o fígado causando infecção hepática podendo levar a carcinomas de vias biliares ou colangiocarcinoma. Em Hong-Kong, a infestação pelo *Clonorchis sinensis* ocorre em

90% dos casos de colangiocarcinomas (Sripa et al., 2003; Hong et al., 2003). A dose recomendada de praziquantel é de 40 mg/Kg (WHO 1995). Contudo, o estabelecimento de uma dose padrão ainda é muito discutido pela OMS, uma vez que dependendo do indivíduo a ser tratado, o peso, idade e altura interferem na dose escolhida (Strandgaard et al., 2007).

Na paragonimíase, infecção pulmonar crônica causada por um trematoda do gênero *Paragonimus*, o praziquantel é indicado em três doses diárias de 25mg/kg por 3 dias consecutivos. O *Paragonimus westermani* é a espécie que apresenta maior incidência nos humanos. Afeta 20 milhões de pessoas no mundo. É endêmica na Ásia Oriental, África, e nas Américas (México e Brasil) (Strobel et al., 2005). No seu ciclo biológico, o homem apresenta-se como hospedeiro definitivo, se infectando através da ingestão de crustáceos de água doce (hospedeiros intermediários) crus ou malcozidos contaminados com metacercárias encistadas (estágio infectante do verme). No intestino delgado, a metacercária se desencista, perfura a parede intestinal, passa à cavidade abdominal, atravessa o diafragma e a pleura, alcançando o pulmão em três a oito semanas (Lm et al., 1997; Kagawa 1997). Os sintomas são inespecíficos e as imagens radiológicas podem ser confundidas com as da tuberculose (Belizário et al., 1997); O pulmão é o principal local de infecção pelo *Paragonimus*, mas pode afetar outros órgãos, principalmente o cérebro (26%) (Lm et al., 1997; Salazar et al., 1987 e Kagawa, 1997).

Em cestodas, o praziquantel tem importância no tratamento da teníase e da neurocisticercose. Esta é ainda um sério problema de saúde pública em áreas endêmicas com *Taenia solium* como América Latina, África e Ásia (Bem 1996). A neurocisticercose é a maior causa de epilepsia em países não islâmicos em desenvolvimento. Ocasionalmente sérios danos na atividade humana, quando não tratado (Pawlowski, Allan e Meinardi 2005).

A teníase ocorre através da ingestão de carne de porco mal cozida contendo cisticercos de *Taenia solium* estes no tubo digestivo do homem sofre ação de enzimas digestivas e da bile, desinvaginam-se dando início ao processo de fixação a mucosa com crescimento do corpo do verme. A cisticercose por sua vez é adquirida quando os ovos, excretados nas fezes de indivíduos com a *T. solium* são ingeridos. No intestino do homem os ovos liberam o embrião, estes cruzam a parede intestinal, atingem a circulação sanguínea e são levados até os tecidos onde se desenvolvem dentro de cistos, mas são destruídos pelo sistema imune do hospedeiro exceto aqueles que ficam em

locais imunologicamente privilegiados como os olhos e o sistema nervoso estabelecendo nestes casos a cisticercose ocular e a neurocisticercose respectivamente (Garcia e Del Brutto 2005)

Na teníase o praziquantel é prescrito na dose de 5mg/Kg em dose única. Na neurocisticercose é o primeiro fármaco a ser prescrito nos Estados Unidos. O praziquantel nesse caso deve ser associado a corticóides. Não havendo resposta ao praziquantel está indicado o uso do albendazol (Shandera, White e Chen 1994; Bittercourt et al., 1990). A posologia mais freqüentemente usada é de doses de 50mg/Kg/dia durante 15 dias.

O praziquantel também se mostrou efetivo no tratamento da esparganose, zoonose muito comum em países asiáticos tendo sido relatado mais de 400 casos no Japão. O agente etiológico é o cestoda *Spirometra erinacei-europaei*, que infecta pequenos crustáceos, os quais são os primeiros hospedeiros intermediários. A infecção em humanos ocorre principalmente por ingestão de carnes mal cozidas ou cruas, de animais que são segundo hospedeiros intermediários como galinhas, rãs, cobra. A migração da larva plerocercóide ocorre dentro de vários órgãos, especialmente tecido e pele subcutânea dos humanos. Em raras ocasiões, locais inespecíficos como cérebro, cavidade torácica ou órgão urogenital também são afetados. O tratamento é feito com o praziquantel na dose de 3,6 g/dia durante três dias (Tanaka et al, 1997).

Na difilobotríase o praziquantel também é eficaz tendo sido obtido cura parasitológica com dose única de 600mg. Assim como a esparganose a difilobotríase é uma zoonose comum na Ásia, sendo adquirida quando acidentalmente se ingere larva plerocercóides presente em peixes infectados. As espécies *Diphyllbothrium latum*, *Diphyllbothrium pacificum* e *Diphyllbothrium nihonkaiense* são os principais patógenos de caso humanos de difilobotríase (Lou et al 2007).

Uso do praziquantel na veterinária

Em cães, o praziquantel é ativo contra cestodas, na dose de 5mg/kg de peso tem uma eficácia de 99 % em uma variedade de *Taenia spp*, *Echinococcus granulosus*, *Dipylidium caninum* (Gemmell, Johjstone e Oudemans 1977; Dorchies, Ducos de Lahitte e Berthanneau 1980).

Também tem efeito sobre a tênia, *Anoplocephala perfoliata*, que causa intussuscepção (invaginação de segmento de alça intestinal para dentro de outro

segmento adjacente) no intestino delgado dos equídeos, podendo também ocorrer oclusão da válvula íleo-cecal, além de peritonites e enterites. Estas são transmitidas aos equídeos através da ingestão do ácaro Oribatídeo (hospedeiro intermediário) presente na pastagem, fenos. O praziquantel em pasta na concentração de 9% apresenta um excelente efeito antihelmíntico (Slocombe 2006). Slocombe em 2007 avaliou o praziquantel em pasta na concentração de 9% em quatro países, Canadá, França, Alemanha e Nova Zelândia tendo apresentando uma eficácia de 100 % na Nova Zelândia, no Canadá e na Alemanha.

É usado intensamente na clínica veterinária, em animais marinhos, em cães, gatos, entre outros. Nos peixes, em preparações orais, o praziquantel é administrado usando um regime de múltiplas doses, para tratar parasitos monogeneos que parasitam peixes da espécie *Seriola lalandi*, em culturas em gaiolas marinhas (Tubbs e Tingle 2006). Esses parasitos podem comprometer o crescimento e ser a causa da morbidade e mortalidade de peixes desta espécie (Ernest et al., 2002; Ogawa e Yokoyama 1998). No intervalo de 24 horas, o praziquantel se acumula na pele e no plasma do peixe. Esse fenômeno é devido ao alto clearance do fármaco, por via hepática ou excreção renal.

Junto a formalina em água fresca, o praziquantel está indicado para tratamento de peixes da espécie *Lutjanus guttatus* acometidos por *Haliotrema* sp e *Euryhaliotrema* sp (monogenea: Ancyrocephalinae) parasitos que habitam as brânquias (Fajer-Ávila, Velásquez-Medina e Bentacourt-Lozano 2007). Outro parasito de brânquias de peixes os *Sparicotyle chrysophrii* (monogenea: Microcotylidae) também são tratados com praziquantel, obtendo uma alta eficácia (Sitja-Babadilla, Felipe e Alvarez-Pellitero 2006).

Praziquantel e resistência

Conforme já citado anteriormente nesta revisão, o praziquantel é o único fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose. Isso é um fato preocupante ao nível de Saúde Pública, uma vez que a esquistossomose é a segunda maior doença parasitária do mundo, afetando 207 milhões de pessoas (Steinmann et al., 2006). Portanto, monitorar o uso do praziquantel é uma condição imperiosa, uma vez que se espera uma demanda cada vez maior desse fármaco em áreas endêmicas para

esquistossomose. Metas traçadas por organizações internacionais e doadores para combate a esquistossomose na África sub saariana foi de se atingir em 2004 aproximadamente 10 milhões de pessoas beneficiadas com o uso do praziquantel. Com isso, o mercado do praziquantel cresceria substancialmente e se o preço for acessível e a resistência ao fármaco evitada, o consumo poderia alcançar 40 milhões de tablets ao ano no final de 2005 (Fenwick et al, 2003).

A possibilidade de resistência ao praziquantel foi relatada inicialmente no Egito e Senegal. No Egito, 1607 pacientes portadores de esquistossomose foram tratados com doses de 40 mg/kg de peso, e duas semanas depois com a dose de 60 mg/kg de peso. Contudo foi observado que em 2,4 % destes pacientes ainda persistia a presença de ovos de *Schistosoma* nas fezes (Ismail et al., 1996). Quando os ovos coletados destes pacientes foram utilizados para manutenção da cepa em laboratório, os camundongos que participaram do ciclo biológico apresentaram uma resistência de 80 % na taxa de cura, sugerindo que os vermes descendentes desta infecção, respondiam com menos intensidade ao tratamento com o praziquantel (Botros et al., 2005). Confirmando a diminuição da resposta ao praziquantel, *in vitro* foi observada diminuição na contração muscular dos vermes (Ismail et al., 1999), diminuição na lesão do tegumento (William et al., 2001), bem como diminuição na entrada de cálcio (William e Botros, 2004).

No Senegal a redução na eficácia do praziquantel foi observada onde focos de infecção de *Schistosoma* tiveram uma taxa de cura de apenas 18 a 36 %, quando o esperado ficaria em torno de 70 a 90 % (Stelma et al., 1995). E mesmo quando houve um aumento na dose de 40 para 60 mg/kg de peso, não se observou aumento significativo na taxa de cura (Guisse et al., 1997).

A compreensão da resistência aos fármacos quando se trata de helmintos é mais difícil do que quando a resistência é bacteriana. Devido a variações na susceptibilidade de diferentes estágios de maturação e sexo dos parasitos. A comparação das

propriedades dos focos isolados resistentes como, por exemplo, os do Senegal, podem ajudar na elucidação do mecanismo de ação do fármaco e a natureza da resistência. A resistência ao fármaco pode ser devido ao retardamento na maturação do parasito, resultando no prolongamento dos estágios imaturos que são naturalmente resistentes ao praziquantel (Redman et al., 1996) ou a mutação ou a ausência de proteínas que atuam como receptores do praziquantel (Day, Bennett e Pax, 1992). A não susceptibilidade dos isolados do Senegal poderia ter várias explicações, dentre as quais a ausência de antígenos de superfície dos vermes, os quais quando reconhecidos pelos anticorpos do hospedeiro apresentam uma ação sinérgica com o sistema imune do hospedeiro depois de tratados com o praziquantel (Redman et al., 1996).

Conclusão

A importância terapêutica que o praziquantel possui sobre a esquistossomose, e sobre uma variedade de espécies trematodas e cestodas responsáveis por zoonoses que a cada tempo emerge no cenário da medicina humana, conduz a uma reflexão no sentido de que ele precisa ser usado com cautela. O monitoramento laboratorial de cepas de áreas endêmicas deve ser uma exigência por parte das autoridades em Saúde Pública, como também incentivos ao desenvolvimento da pesquisa farmacêutica no sentido de se buscar novas formulações que visem um melhor aproveitamento do princípio ativo podendo com isso reduzir doses e evitar o aparecimento de resistência.

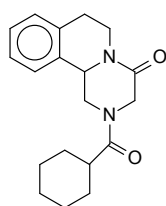


Figura 1 - Estrutura Química do Praziquantel

Tabela I: Fontes Laboratoriais de Praziquantel

Laboratório Farmacêutico	Nome Comercial	Apresentação Farmacêutica
Bayer	Biltricide	Comprimido de 600mg
Bayer	Droncit	Comprimido de 600mg; Injeção 56.8mg/mL
EIPICO	Epiquentel	Xarope 600mg/5mL
EIPICO	Distocide	Comprimido de 600mg
Pharco	Bilharzid	Comprimido de 600mg
Cosmos	Prazitel	Comprimido de 600mg
	Pyquiton	Pílulas 200mg
Shin Poong	Distocide	Comprimidos de 600mg
Far-Manguinhos	Praziquantel	Comprimido de 600mg

Tabela II: Espectro de Atuação do Praziquantel

Doença	Agente Etiológico	Dose recomendada de Praziquantel
Esquistossomose	<i>Schistosoma mansoni</i>	2 doses de 25mg/Kg em intervalos de 4 horas
	<i>Schistosoma intercalatum</i>	40mg/Kg em dose única
	<i>Schistosoma haematobium</i>	40mg/Kg em dose única
	<i>Schistosoma japonicum</i>	3 doses de 20mg/Kg em intervalo de 4 horas
	<i>Schistosoma mekongi</i>	3 doses de 20mg/Kg em intervalo de 4 horas
Opistorquíase	<i>Opisthorchis viverrini</i>	40mg/Kg
	<i>Clonorchis sinensis</i>	
Paragonimíase	<i>Paragonimus westermani</i>	25mg/Kg em 3 dias
Teníase	<i>Taenia solium</i>	Dose única de 5mg/Kg
	<i>Taenia saginata</i>	
Neurocisticercose		50mg/Kg por 15 dias
Difilobotríase	<i>Diphyllobothrium latum</i>	Dose única de 600mg
	<i>Diphyllobothrium pacificum</i>	
	<i>Diphyllobothrium nihonkaiense</i>	
Espargonose	<i>Spirometra erinacei-europaei</i>	3,6g/dia por 3 dias

New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs

Maira GR Pitta/⁺, Andréa CA Silva, Juliana Kelle AL Neves, Poliana G Silva, João I Irmão*, Elizabeth Malagueño**, José V Santana**, Maria CA Lima, Suely L Galdino, Ivan R Pitta, Mônica CPA Albuquerque*/**

Departamento de Antibióticos *Departamento de Medicina Tropical **Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/nº, Cidade Universitária, 50670-901 Recife, PE, Brasil

The emergence of strains of Schistosoma resistant to praziquantel has drawn attention to the search for new schistosomacide drugs. Imidazolidinic derivatives have performed outstandingly against adult S. mansoni worms when evaluated in vitro. The molecular modification of imidazolidine by way of bioisosteric replacement gives rise to variations in its biological response. This study verifies the potential of substituent groups in the derivatives (Z)3-benzyl-5-(2-fluoro-benzylidene)-imidazolidine-2,4-dione NE4, 3-benzyl-5-(4-chloro-arylazo)-4-thioxo-imidazolidin-2-one PT5, 3-benzyl-5-(3-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one JT53; 3-benzyl-1-methyl-5-(4-methyl-benzylidene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one JT63; 3-benzyl-1-methyl-5-(4-methoxy-benzylidene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one JT68; 3-(4-chloro-benzyl)-1-methyl-5-(4-methoxy-benzylidene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one JT69; 3-(4-phenyl-benzyl)-1-methyl-5-(4-methoxy-benzylidene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one JT72 by determining the viability in vitro of adult S. mansoni worms in the presence of these derivatives. The susceptibility of the worms obtained from mice and kept in culture in the presence of different concentrations was determined by way of schistosomacide kinetic, observed every 24 h over a period of eight days. The results show that the worms were more sensitive to the PT5 derivative at a concentration of 58 µM which killed 100% of the worms after 24 h of contact, also giving rise to alterations in the tegument surface of the worms with the formation of bubbles and peeling. These observations suggest a strong electronic contribution of the arylazo grouping in the biological response.

Key words: *Schistosoma mansoni* - imidazolidines - in vitro susceptibility

Schistosomiasis is still a major public health problem in Africa, Eastern Europe, Asia, and South America (WHO 1993). For some species of *Schistosoma* that infect humans, praziquantel, an isoquinolin-4-one, is the only effective drug (Davis & Wegner 1979). However, its continuous use for more than 25 years, against infections caused by both cestodes and trematodes, has made the parasites resistant (Silva et al. 2005). At present, various research groups are dedicating themselves to identifying new schistosomacide agents obtained from natural (Hamed & Hetta 2005, Tallima et al. 2005, Massoud et al. 2005) and synthetic sources (Bahgat et al. 2005, Abass & Mostafa 2005).

The imidazolidines are a broad class of bioactive compounds that also have schistosomacide properties. Niridazol, 1-(5-nitro-thiazol-2-yl)-imidazolidin-2-one, the drug used in the last century, has been widely used for clinical purposes (Cioli et al. 1995).

The schistosomacide properties of imidazoline derivatives has been shown in the case of adult *S. mansoni* worms in in vitro studies (Oliveira et al. 2004, Albuquerque et al. 2005).

It is known that the structural variations lead to alterations in the physical properties and reactivity of the chemical compounds, thereby giving rise to changes in the distribution in the cells and tissues and in access to the active enzyme and receptor centers. The molecular modification of imidazolidine by bioisosteric replacement produces a biological response. This study evaluated the schistosomacide effect of imidazolidine derivatives with different substituent groups by determining their in vitro viability against adult *S. mansoni* worms.

New 3-benzyl-5-benzylidene-1-methyl-2-thioxo-imidazolidine JT derivatives were obtained in four stages. At first, *N*-methyl-glycine or sarcosine reacts with ammonium thiocyanate to form 1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one. At the same time, Cope esters are obtained by the reaction of substituted benzaldehydes with ethyl cyanoacetate in the presence of piperidine (Cope et al. 1941). To obtain the intermediary substitutes in position 5 of the 2-thioxo-imidazolidine nucleus, an addition reaction like that of Michael's was used reacting 1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one with the different Cope esters, to obtain the 5-benzylidene-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one derivatives, which react with benzyl bromide to produce the 3-benzyl-5-benzylidene-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one derivatives JT.

The synthesis and the physico-chemical properties of the derivatives (Z)3-benzyl-5-(2-fluoro-benzylidene)-imidazolidine-2,4-dione NE4 (Lima et al. 1992) and 3-benzyl-5-(4-chloro-arylazo)-4-thioxo-imidazolidin-2-one PT5

Financial support: Finep, CNPq

⁺Corresponding author: jcmonica@globo.com

Received 25 May 2006

Accepted 26 June 2006

(Brandão et al. 1997) are described in the literature. Crystallographic study of **NE4** proved it to have a *Z* configuration (Simone et al. 1996).

MATERIALS AND METHODS

The BH strain of *S. mansoni* was kept in the laboratory after it had passed through *Biomphalaria glabrata* molluscs and Swiss mice (*Mus musculus*). Mice weighing between 20 and 25 g were infected by exposure to a cercarian suspension of *S. mansoni* with approximately 150 cercarias, using the tail immersion technique (Olivier & Stirewalt 1952).

After seven weeks of infection, the adult *S. mansoni* worms were removed from the mesenteric and portal veins of the infected mice under aseptic conditions (Duvall & Dewitt 1967). The worms were washed in a RPMI1640 (Sigma) medium kept at pH 7.5 with HEPES 20 mM and supplemented with penicillin (100 UI/ml), streptomycin (100 µg/ml) and 10% bovine fetal serum (Cutilab) and transferred to tissue culture plates containing 2 ml of the same medium. Each well received two worms and these were then incubated at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO₂.

The experiments were approved by the Federal University of Pernambuco's Animal Experiments Ethics Committee, Process no. 185/2004, in accordance with Law 9605 Article 32 Decree 3179 – Art 17.

For the in vitro test with *S. mansoni*, these compounds were dissolved in 1.6% dimethyl sulphoxide (DMSO) and used in concentrations varying from 29 to 640 µM, which were added to the medium containing the worms after a period of 2 h of adaptation to the culture medium. Duplicates were carried out for each concentration used. The parasites were kept for 8 days and monitored every 24 h to evaluate their general condition: motor activity, alterations in the tegument, mortality rate. The control worms were treated with 1.6% of DMSO in an RPMI 1640 medium.

RESULTS

Chemical - In order to obtain the new 3-benzyl-5-benzylidene-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one derivative compounds (**JT**) 5-benzylidene-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one, potassium carbonate as a catalyst and methanol as a solvent were placed in a flask. The reactional mixture was constantly shaken at room temperature for one hour. Subsequently, the substituted benzyl bromide was added. All reactions were accompanied by chromatographic analysis in a thin layer by way of an adequate elution system. The 3-benzyl-5-benzylidene-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one derivatives **JT** were purified by washing with suitable solvents. The fusion points were determined in capillary tubes using a Buchi apparatus. Thin layer chromatography was carried out on Merck 60F254 silicagel chromatoplates. The infra-red spectra were produced on KBr tablets at a concentration of 1% using a Perkin Elmer 1310 spectrometer. The magnetic nuclear resonance spectra of ¹H NMR protons was carried out using a Bruker AC 200 spectrophotometer in DMSO-d₆ or CDCl₃ as a solvent and the mass spectra using a Delsi-Nermag R 1010 C spectrometer on electronic impact.

3-benzyl-5-(3-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one **JT53**

C₁₈H₁₅FN₂OS Yield 41%, M.p. 183-184°C, *R_f* (CHCl₃:CH₃OH 8:2) 0.66, IR (KBr): ν 1680, 1460, 1570 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 3.3 (s, 3H, NCH₃), 4.57 (s, 2H, CH₂), 6.82 (s, 1H, CH), 7.28-7.48 (m, 5H, benzyl), 7.19-7.26 (m, 1H, benzylidene, 4"), 7.28-7.48 (m, 1H, benzylidene, 5"), 7.87 (d, 1H, benzylidene, 2", *J*=7.81), 9.33-9.39 (m, 1H, benzylidene, 6"). MS *m/z* (%) 326(M⁺. 100), 327 (M⁺.+1 13.7), 328 (M⁺.+2 3.38), 293(89), 235(12.5), 148(17.1).

3-benzyl-1-methyl-5-(4-methyl-benzylidene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one **JT63**

C₁₉H₁₈N₂OS Yield 57%, M.p. 187-189°C, *R_f* (CHCl₃:CH₃OH 6:4) 0.81, IR (KBr): ν 1770, 1600, 1460 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃): δ 2.39(s, 3H, CH₃), 3.28 (s, 3H, NCH₃), 4.62 (s, 2H, CH₂), 6.4 (s, 1H, CH), 7.42-7.46 (m, 2H, benzyl, 2'6'), 7.31-7.35 (m, 3H, benzyl, 3'4'5'), 7.22 (d, 2H, benzylidene, 3"5" *J*=8.1Hz), 8.11 (d, 2H, benzylidene, 2"6" *J*=8.1Hz). MS *m/z* (%) 322(M⁺. 44.19), 323 (M⁺.+1 10.97), 324 (M⁺.+2 1.29), 298(24.2), 145(87.7), 130(58.7), 91(100), 65(43.2).

3-benzyl-1-methyl-5-(4-methoxy-benzylidene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one **JT68**

C₁₉H₁₈N₂O₂S Yield 56%, M.p. 178-180°C, *R_f* (CHCl₃:CH₃OH 6:4) 0.78, IR (KBr): ν 1680, 1590, 1460 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-d₆): δ 3.29 (s, 3H, NCH₃), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 4.58 (s, 2H, CH₂), 6.79 (s, 1H, CH), 7.29-7.48 (m, 3H, benzyl, 3'4'5'), 7.45-7.48 (m, 2H, benzyl, 2'6'), 6.99 (d, 2H, benzylidene, 3"5" *J*=8.6Hz), 8.32 (d, 2H, benzylidene, 2"6" *J*=8.6Hz). MS *m/z* (%) 338(M⁺. 21.64), 339 (M⁺.+1 3.18), 340 (M⁺.+2 0.32), 305(8.6), 161(31.9), 146(100), 91(41.8), 65(17.3).

3-(4-chloro-benzyl)-1-methyl-5-(4-methoxy-benzylidene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one **JT69**

C₁₉H₁₇ClN₂O₂S Yield 53%, M.p. 219-219°C, *R_f* (CHCl₃:CH₃OH 6:4) 0.82, IR (KBr): ν 1670, 1590, 1460 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃): δ 3.28 (s, 3H, NCH₃), 3.86 (s, 3H, OCH₃), 4.57 (s, 2H, CH₂), 6.39 (s, 1H, CH), 7.29 (d, 2H, benzyl, 2'6' *J*=8.7Hz), 7.29 (d, 2H, benzyl, 3'5' *J*=8.7Hz), 6.88 (d, 2H, benzylidene, 3"5" *J*=8.8Hz), 8.25 (d, 2H, benzylidene, 2"6" *J*=8.8Hz). MS *m/z* (%) 372(M⁺. 13.29), 373 (M⁺.+1 3.79), 374 (M⁺.+2 6.31), 161(22.1), 146(100), 125(43.4), 90(6.5), 63(17.8).

3-(4-phenyl-benzyl)-1-methyl-5-(4-methoxy-benzylidene)-2-thioxo-imidazolidin-4-one **JT72**

C₂₅H₂₂N₂O₂S Yield 67%, M.p. 157-159°C, *R_f* (CHCl₃:CH₃OH 6:4) 0.76, IR (KBr): ν 1670, 1590, 1450 cm⁻¹. ¹H NMR (CDCl₃): δ 3.21 (s, 3H, NCH₃), 3.84 (s, 3H, OCH₃), 4.6 (s, 2H, CH₂), 6.34 (s, 1H, CH), 7.63-7.65 (m, 1H), 7.25-7.43 (m, 8H, benzyl), 6.92 (d, 2H, benzylidene, 3"5" *J*=8.8Hz), 8.23 (d, 2H, benzylidene, 2"6" *J*=8.8Hz). MS *m/z* (%) 414(M⁺. 30.78), 415 (M⁺.+1 4.36), 167(75.8), 166(49.2), 165(100), 161(25.6), 152(40.9), 146(93.2), 91(9.6).

Biological - The evaluation of the in vitro susceptibility of *S. mansoni* to the 2-thioxo-imidazolidin-4-one derivatives **JT53**, **JT63**, **JT68**, **JT69**, **JT72** revealed that the worms were sensitive during the first 24 h to the compounds **JT53**, **JT63**, and **JT72**, the highest mortality rate

occurring after 48 h of contact at a concentration of 644 μM . The **JT68** and **JT69** compounds, at the same concentration, achieved their maximum response after 72 h. The **JT53** and **JT72** compounds killed around 9 and 16% of the worms respectively with the lower concentration used. Adult male worms, when submitted to the action of derived arylazo imidazolidine **PT5** were shown to be sensitive at all the concentrations used with 100% mortality after 24 h of contact. In the case of female worms, a clear relation was observed between the concentration used and the effect after a period of 24 h. The maximum effect achieved, at concentrations of 58 μM and 116 μM , was after 96 and 72 h, respectively. The sensitivity of the adult *S. mansoni* worms to the imidazolidine-2,4-dione derivative **NE4** could be seen from the first day of treatment onwards. A maximum response of 100% mortality was

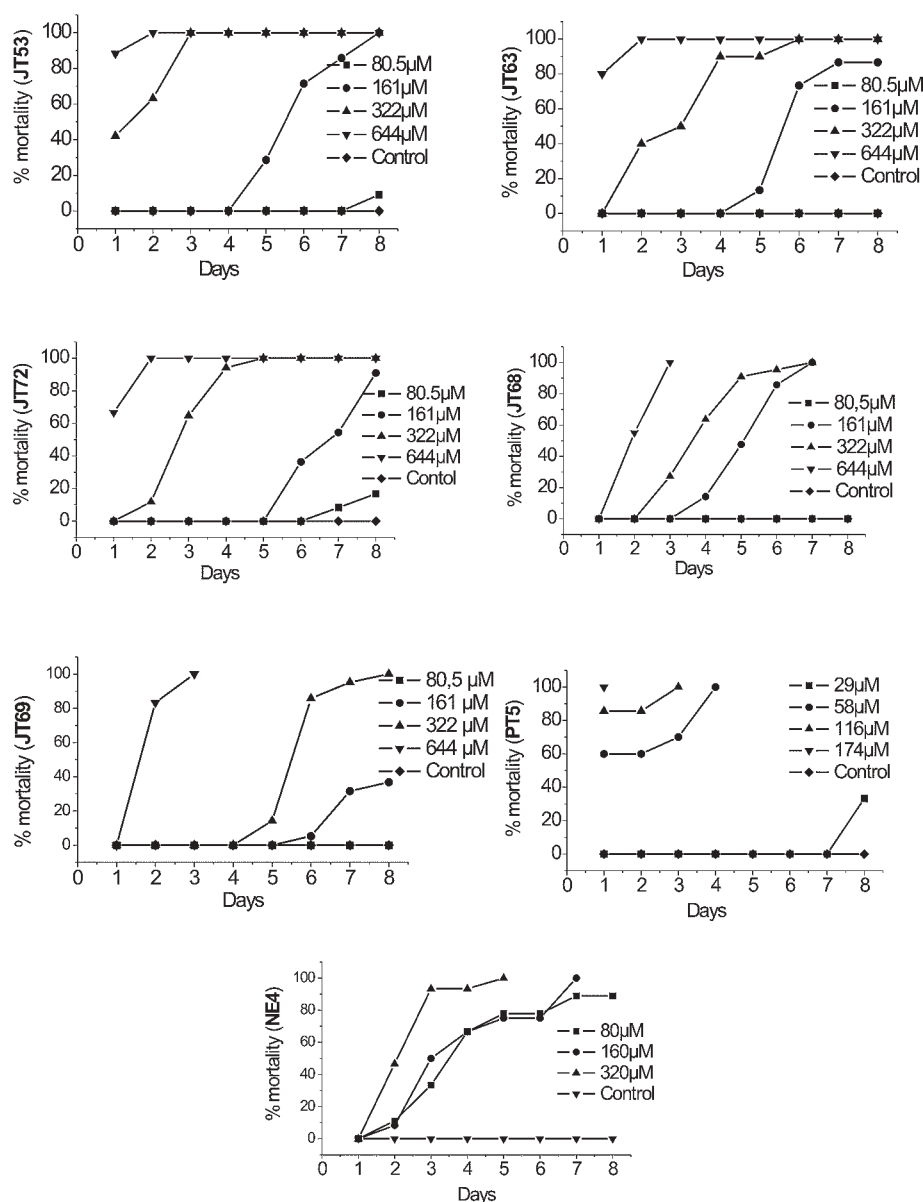
achieved at the end of the fourth day of exposure to the 320 μM concentration (Figure).

In all the experiments, the control group remained viable throughout the observation period, and were submitted only to the vehicle used to dissolve the different compounds.

DISCUSSION

The mortality kinetic of adult *S. mansoni* worms in the presence of imidazolidine derivatives was used to evaluate the schistosomacide properties of the imidazolidine derivatives studied.

It can be seen from Table that the compound arylazo imidazolidine **PT5** caused 100% mortality of worms at a concentration of 29 μM in the course of a period of 24 h of contact and was the most active compound. The 2-thioxo-



Mortality of adult *Schistosoma mansoni* worms in the presence of imidazolidine derivatives.

TABLE

Concentration and contact time capable of producing 100% mortality of adult *Schistosoma* worms

Compound	Concentration	Contact time (h)
JT68	640 μ M	72h
JT69	640 μ M	48h
JT72	640 μ M	48h
JT53	640 μ M	48h
JT63	640 μ M	48h
NE4	320 μ M	96h
PT5	174 μ M	24h

imidazolidin-4-one derivatives **JT53**, **JT63**, **JT68**, **JT69**, and **JT72** only reached a similar percentage mortality of worms at a concentration of 644 μ M, after 48 h. The longest period of time taken to cause the death of all the worms was 96 h of contact at a concentration of 320 μ M in the case of the **NE4** derivative.

All the derivatives studied caused alterations in the tegument surface of the worms with the formation of bubbles and peeling, indicating damage to cells, an effect directly related to the duration of exposure. It was also observed that schistosomacide properties followed a dose-response dependent relation.

The mortality rate and the lesions in the teguments suggest that the imidazolidine derivatives are active against *S. mansoni*. The 3-benzyl-5-(4-chloro-arylazo)-4-thioxo-imidazolidin-2-one **PT5** derivative proved to be the most active, probably owing to the participation of the arylazo grouping.

REFERENCES

- Abass M, Mostafa BB 2005. Synthesis and evaluation of molluscicidal and larvicidal activities of some novel enaminones derived from 4-hydroxyquinolinones: part IX. *Bioorg Med Chem* 13: 6133-6144.
- Albuquerque MCA, Silva TG, Pitta MGR, Silva ACA, Silva PG, Malagueño E, Santana JV, Wanderley AG, Lima MCA, Galdino SL, Barbe J, Pitta IR 2005. Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioxo-imidazolidine compounds. *Pharmazie* 60: 13-17.
- Bahgat MM, Maghraby AS, Heiba ME, Ruppel A, Fathalla OA 2005. Synthesis of new 4-oxo-2-thioxo-1,2,3,4-tetrahydropyrimidine derivatives with an incorporated thiazolidinone moiety and testing their possible serine protease and cercarial elastase inhibitory effects with a possible prospective to block penetration of *Schistosoma mansoni* cercariae into the mice skin. *Arch Pharm Res* 28: 1002-1012.
- Brandão SSF, Rocha Filho JA, Chantegrel J, Albuquerque JFC, Ximenes EA, Galdino SL, Pitta IR, Perrissin M, Luu-Duc C 1997. Synthèse et structure des arylazo-imidazolidines et arylidèneimidazolidines substituées. *Ann Pharm Françaises* 55: 206-211.
- Cioli D, Pica-Mattoccia L 2003. Praziquantel. *Parasitol Res* 90: S3-9.
- Cioli D, Pica-Mattoccia L, Archer S 1995. Antischistosomal drugs: past, present ... and future? *Pharmac & Ther* 68: 35-85.
- Cope AC, Hofmann CM, Wyckoff C, Hardenber E 1941. Condensation reactions. II. Alkylidene cyanoacetic and malonic ester. *J Am Chem Soc* 63: 3452-3456.
- Davis A, Wegner DH 1979. Multicentre trials of praziquantel in human schistosomiasis: design and techniques. *Bull WHO* 57: 767-771.
- Duvall RH, Dewitt WB 1967. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am J Trop Med Hyg* 16: 483-486.
- Hamed MA, Hetta MH 2005. Efficacy of Citrus reticulata and Mirazid in treatment of *Schistosoma mansoni*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 771-778.
- King CH, Muchiri EM, Ouma JH 2000. Evidence against rapid emergence of praziquantel resistance in *Schistosoma haematobium*, Kenya. *Emerg Infect Dis* 6: 585-594.
- Lima MCA, Costa DLB, Goes AJS, Galdino SL, Pitta IR, Luu-Duc C 1992. Synthèse et activité antimicrobienne de dérivés chlorobenzyl benzylidène imidazolidinediones et thiazolidinediones substituées. *Pharmazie* 47: 182-184.
- Massoud AM, el Ebiary FH, Ibrahim SH 2005. Light microscopic study of the effect of new antischistosomal drug (myrrh extract) on the liver of mice. *J Egypt Soc Parasitol* 35: 971-988.
- Oliveira SM, Albuquerque MCPA, Pitta MGR, Malagueño E, Santana JV, Lima MCA, Pitta IR, Galdino SL 2004. A resposta do *Schistosoma mansoni* mantido in vitro frente a derivados imidazolidinônicos. *Acta Farm Bonaerense* 23: 343-348.
- Oliver L, Stirewalt MA 1952. An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *J Parasitol* 38: 19-23.
- Silva IM, Thiengo R, Conceicao MJ, Rey L, Lenzi HL, Pereira Filho E, Ribeiro PC 2005. Therapeutic failure of praziquantel in the treatment of *Schistosoma haematobium* infection in Brazilians returning from Africa. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 445-449.
- Simone CA, Pereira MA, Luu-Duc C, Pitta IR, Galdino SL, Menezes EHC, Schpector JZ 1996. 3-benzyl-5-(2-fluorobenzylidene)-imidazolidine-2,4-dione. *Acta Christ* 52: 2771-2772.
- Tallima H, Salah M, El-Ridi R 2005. In vitro and in vivo effects of unsaturated fatty acids on *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* lung-stage larvae. *J Parasitol* 91: 1094-1102.
- WHO-World Health Organization 1993. WHO Technical Report. The control of schistosomiasis: second report of the WHO Expert Committee. Vol. 830. Geneva.