

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Carlos André Laranjeira Miranda Filho

**Estudo do potencial terapêutico de novos fármacos na atividade
esquistossomicida**

RECIFE
2016

Carlos André Laranjeira Miranda Filho

**Estudo do potencial terapêutico de novos fármacos na atividade
esquistossomicida**

Dissertação apresentada ao curso de Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz como parte do requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Sheilla Andrade de Oliveira

Coorientadora: Dra. Ana Cristina de Lima Leite

RECIFE

2016

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

M672e Miranda Filho, Carlos André Laranjeira.
Estudo do potencial terapêutico de novos fármacos na atividade esquistossomicida / Carlos André Laranjeira Miranda Filho. - Recife: [s.n.], 2016.
72 p. : ilus.

Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

Orientadora: Sheilla Andrade de Oliveira.

Coorientadora: Ana Cristina de Lima Leite.

1. Esquistossomose - terapia. 2. Anti-Helmínticos - uso terapêutico. 3. Anti-Helmínticos - administração & dosagem. 4. Schistosoma mansoni - efeitos de drogas. 5. Schistosoma mansoni - ultraestrutura. 6. Ftalimidas - farmacologia. 7. Tiazol - farmacologia. 8. Estudos de avaliação. 9. Estudo comparativo. I. Oliveira, Sheilla Andrade de. II. Leite, Ana Cristina de Lima. III. Título.

CDU 616.995.122

Carlos André Laranjeira Miranda Filho

**Estudo do potencial terapêutico de novos fármacos na atividade
esquistossomicida**

Dissertação apresentada ao curso de
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães,
Fundação Oswaldo Cruz como parte do
requisito para obtenção do título de Mestre
em Ciências.

Aprovado em: 25 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Sheilla Andrade de Oliveira
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

Dr. Lindomar José Pena -
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães – CPqAM/FIOCRUZ

Dr. Marcos Veríssimo de Oliveira Cardoso
Universidade Federal de Pernambuco – UFPE

À minha mãe

Verônica Lúcia Ribeiro Miranda

Que mesmo nas dificuldades
sempre me guiou pelo caminho
certo da vida.

À minha família Ribeiro

Por sempre me incentivar na
carreira acadêmica, em especial
minha avó Lúcia Ribeiro.

À minha sogra

Flávia Carvalho

Por me acolher em sua casa nos
momentos em que precisei sair
tarde do Aggeu Magalhães.

À minha namorada

Juliana Carvalh. Pela parceria e
apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

A FIOCRUZ PERNAMBUCO

Ao Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular
Ao Laboratório de Planejamento e Química Medicinal da UFPE
Ao Biotério experimental do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, Professora Dra. Sheilla Andrade de Oliveira por todo ensinamento e por me dá a oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, o que me fez crescer cientificamente.

À minha co-orientadora Professora Dra. Ana Cristina Lima Leite por todo suporte científico e por toda a disponibilidade sempre que precisei.

À Miria de Oliveira Barbosa pela colaboração e amizade durante esses dois anos, sendo importante em todas as etapas da realização desse trabalho.

A equipe do Laboratório de Imunopatologia e Biologia Molecular (LIBM).

À Versuka Alexandrino, por todo suporte técnico e científico,

À Roni Evêncio pelo exemplo de profissionalismo,

À Renata Leão pela colaboração e por ter me indicado para fazer parte do grupo,

À Edna Santiago por todo o conhecimento passado em nossas reuniões.

A equipe do Laboratório de Planejamento e Química Medicinal por me receber de braços abertos, em especial Arsênio Rodrigues por sintetizar as moléculas utilizadas nesse trabalho.

A Barnabé, por toda a ajuda no momento em que tentaram dificultar o andamento do projeto.

Aos professores Dr. Fábio Brayner e Dr. Luiz Carlos Alves, e a toda equipe do LBCM por toda colaboração e disponibilidade.

A todos os colegas de mestrado por dividir todos os momentos árdusos na disciplina de Biologia Molecular, em especial Nairromberg pela colaboração além da sala de aula.

“Não são as respostas que movem o mundo, são as perguntas”

Albert Einstein

MIRANDA FILHO, Carlos André Laranjeira. Estudo do potencial terapêutico de novos fármacos com atividade esquistossomicida. 2016. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença endêmica de áreas tropicais e subtropicais causada por helmintos do gênero *Schistosoma* que vem persistindo ao longo dos anos como um grave problema de saúde pública. Atualmente o praziquantel (PZQ) é o único fármaco utilizado na terapêutica da esquistossomose. Embora tenha eficácia comprovada, há uma necessidade de desenvolver novas drogas, pois tem sido descrito que o uso repetido do PZQ em áreas de endêmicas pode causar uma redução temporária na eficácia. Neste contexto, os ftalil-tiazóis são descritos como uma alternativa promissora na busca por novos fármacos para o tratamento da esquistossomose. Nosso estudo teve como objetivo avaliar a atividade esquistossomicida de seis derivados ftalil-tiazóis. Nos ensaios de eficácia, camundongos *Swiss* foram infectados com 120 cercárias e após cinquenta cinco dias realizou-se a recuperação de vermes. Os vermes de *Schistosoma mansoni* foram obtidos e incubados em placa de cultura com os derivados em seis concentrações diferentes (5 a 100µg/mL) durante um período de 144h. Os derivados com melhores resultados (AS-09 e AS-10) foram submetidos à análise ultraestrutural. O composto AS-09 destacou-se por apresentar atividade antes de 24h e por isso foi avaliado no tratamento, por via intraperitoneal e oral, de camundongos na fase aguda da esquistossomose mansônica. Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que os derivados AS-09 e AS-10 foram os mais promissores da série, os quais apresentaram 100% de eficácia contra vermes adultos, inibição da oviposição e alterações ultraestruturais severas. Na avaliação experimental foi verificada a eficácia do composto AS-09 no tratamento da esquistossomose, reduzindo o número de vermes recuperados (VO 85,25%; VIP 69,23%) e a quantidade de ovos imaturos. O estudo evidenciou que a molécula AS-09 se mostrou promissora como uma alternativa terapêutica para esquistossomose mansônica, se candidatando a um posterior ensaio clínico.

Palavras-chave: Esquistossomose; *Schistosoma mansoni*; ftalimida; tiazol.

MIRANDA FILHO, Carlos André Laranjeira. Study of the potential of new therapeutic drugs in antischistosomal activity. 2016. Dissertation (Masters in Biosciences and biotechnology for health) – Research Center Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2016.

ABSTRACT

Schistosomiasis is an endemic disease in tropical and subtropical areas caused by helminthes of the *Schistosoma* genus that has persisted over the years as a major public health problem. Currently praziquantel (PZQ) is the only drug used in the treatment of schistosomiasis. Although it has been proven effective, there is a need to develop new drugs, since the using of PZQ for many times in endemic areas a temporary reduction of its effectiveness has been reported. In this context, the phthalyl-thiazoles are described as a promising alternative in the search for new drugs for the treatment of schistosomiasis. Our study aimed to evaluate the activity schistosomicide of six phthalyl-thiazoles derivatives. For the tests of effectiveness, Swiss mice were infected with 120 cercariae. After fifty five days, the worms were recovered and incubated in a cell culture plate with derivatives in six different concentrations (5 to 100µg/mL) over a period of 144h. Derivatives that showed better results (AS-09 and AS-10) were used in the trial with parasites that were incubated with 100µg/mL of the drug for 2 h and 22h for the ultrastructural analysis. The AS-09 compound stood out for presenting activity before 24h and so was evaluated for the intraperitoneally and orally mice treatment in acute schistosomiasis. The outcomes of this study demonstrated that derivatives AS-09 and AS-10 were the most promising of the series, which displayed 100% effectiveness against adult worms, inhibition of oviposition and severe ultrastructural damages. In the experimental evaluation of the efficacy, AS-09 compound in the treatment of schistosomiasis has been verified by reducing the number of worms recovered (VO 85.25%; VIP 69.23%) and of the quantity of immature eggs. The study showed that the AS-09 molecule has shown considerable promise as an alternative treatment for schistosomiasis, requiring further assessment in experimental therapy for a later clinical trial proposition.

Keywords: Schistosomiasis; *Schistosoma mansoni*; phthalymide; thiazole.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Fases evolutivas do <i>S. mansoni</i>	14
FIGURA 2: Ciclo de vida do <i>Schistosoma</i>	15
FIGURA 3: Forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica	17
FIGURA 4: molécula do praziquantel.....	19
FIGURA 5: Estrutura química da mefloquina	21
FIGURA 6: Estrutura química do 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzildeno)- imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4).....	22
FIGURA 7: Núcleo heterocíclico da ftalimida na molécula da talidomida.	23
FIGURA 8: molécula do tiazol.....	24
FIGURA 9: Sistema de plaqueamento utilizado nos ensaios in vitro.	29
FIGURA 10: Efeito dos derivados ftalil-tiazóis na mortalidade de <i>S. mansoni</i> em teste in vitro na concentração de 100µg/mL.	35
FIGURA 11: MEV de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> após 22h de incubação com DMSO e 2h com PZQ	40
FIGURA 12: MEV de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> após 2h e 22h de incubação com o composto AS-09. A e B: mostram fêmeas de <i>S.mansoni</i>	41
FIGURA 13: MEV de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> após 2h e 22h de incubação com o composto AS-10.....	43
FIGURA 14: Quantidade de ovos de <i>S.mansoni</i> no fígado total de camundongos Swiss tratados com o composto AS-09.....	44
FIGURA 15: Quantidade de ovos de <i>S.mansoni</i> no intestino total de camundongos Swiss tratados com o composto AS-09.....	45
FIGURA 16: Número de vermes adultos de <i>S.mansoni</i> recuperados de camundongos Swiss tratados com o composto AS-09.....	46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos para a série de ftalil-tiazóis.	33
TABELA 3: Efeito in vitro dos derivados ftalil-tiazóis contra vermes adultos de <i>S.mansoni</i> nas concentrações de 5 a 100 µg/mL.	35
TABELA 4: Escala de motilidade dos vermes controle e tratados com PZQ e com os derivados ftalil-tiazóis.	37
TABELA 5 – Diferença no estadiamento dos ovos encontrados no intestino de camundongos tratados com o composto AS-09 por via oral e intraperitoneal em relação aos grupos controles.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIP – Grupo controle via intraperitoneal

CO – Grupo controle via oral

DMSO – dimetilsulfóxido

IL - interleucina

IFN- γ – interferon gama

LPS – lipopolissacarídeo

PZQ – praziquantel

Th – Linfócito T auxiliar

VO – Grupo tratado com o composto AS-09 por via oral

VIP – Grupo tratado com o composto AS-09 por via intraperitoneal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Ciclo da esquistossomose mansônica	13
2.2 Patogenia da esquistossomose mansônica.....	15
2.3 Tratamento.....	17
2.4 Perspectivas de novos fármacos	20
2.5 Ftalimida.....	22
2.6 Tiazóis.....	24
3. JUSTIFICATIVA	25
4. OBJETIVOS	26
4.1 Objetivo geral.....	26
4.2 Objetivos específicos.....	26
5. MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1 Moléculas	27
5.2 Ensaio de citotoxicidade.....	27
5.3 Infecção pelo <i>S. mansoni</i>	28
5.4 Avaliação da suscetibilidade in vitro de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> frente aos compostos ftalil-tiazóis.....	28
5.5 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com os derivados ftalil-tiazóis.	29
5.6 Avaliação da suscetibilidade in vivo de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> frente aos compostos ftalil-tiazóis.....	30
5.7 Avaliação parasitológica	31
5.7.1 Obtenção e contagem dos vermes adultos	31
5.7.2 Oograma	31
5.7.3 Contagem dos ovos do fígado e no intestino	32
5.8.4 Determinação da eficácia do tratamento	32
5.8 Análise estatística.....	32
5.9 Aspectos éticos.....	32
6. RESULTADOS	33
6.1 Determinação da citotoxicidade em esplenócitos de camundongos.....	33
6.2 Efeito esquistossomicida dos derivados ftalil-tiazóis na concentração de 100 µg/mL sobre vermes adultos de <i>S. mansoni</i>	34
6.3 Efeito dos candidatos ftalil-tiazóis nas concentrações de 5 a 100 µg/mL.....	35
TABELA 2: Efeito in vitro dos derivados ftalil-tiazóis contra vermes adultos de <i>S. mansoni</i> nas concentrações de 5 a 100 µg/mL.	35

6.4. Alterações ultraestruturais induzidas pelos compostos AS-09 e AS-10 em vermes adultos de <i>S.mansoni</i>	38
6.5 Tratamento na esquistossomose experimental do composto AS-09.....	44
6.5.1 Quantidade de ovos no fígado e no intestino	44
6.5.2 Estádios dos ovos encontrados no Oograma.....	45
6.5.3. Efeito do composto AS-09 na recuperação de vermes.....	46
8. CONCLUSÕES	53
REFERÊNCIAS	54
ANEXO A – Parecer da CEUA	70

1. INTRODUÇÃO

As esquistossomoses são infecções parasitárias causadas por helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma*. Amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, geram um grave problema de saúde pública que persiste ao longo dos anos (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2013). No Brasil, existe apenas a esquistossomose mansônica que tem como agente etiológico o *S. mansoni* (BRASIL, 2005).

Atualmente, o tratamento da esquistossomose baseia-se principalmente na quimioterapia, utilizando praticamente um único fármaco, o praziquantel (PZQ) (FERRARI et al., 2003). O PZQ é um derivado pirazinoisoquinolina, que passou a ser utilizado como principal fármaco no tratamento da esquistossomose, devido: a sua eficácia contra todas as espécies do *Schistosoma* que infectam os seres humanos; aos menores efeitos colaterais apresentados pelos indivíduos após tratamento em relação aos esquistossomicidas anteriores, e ao seu baixo custo (SHOAHONG et al., 2006; FENWICK et al., 2006; JEZIORSK et al., 2006; UTZINGER et al., 2001; TALLIMA et al., 2007).

Os mecanismos de ação responsáveis pela eficácia terapêutica do praziquantel ainda não foram totalmente esclarecidos. Todavia, já é proposto que esse medicamento atue no influxo de íons de cálcio causando espasmos, danos no tegumento e paralisia muscular nos vermes adulto (TALLIMA et al., 2007; CIOLI et al., 1998; ISMAIL et al., 1999; GREENBERG et al., 2005; JIRAUNGKOORSKUL et al., 2005).

Em estudos realizados em áreas endêmicas foi relatada a possibilidade de resistência do *Schistosoma* ao tratamento com PZQ devido à baixa taxa de cura obtidas nessas regiões (ISMAIL et al., 1999; FALLON et al., 1995; STELMA et al., 1995; GUISSÉ et al., 1997), além disso, estudos experimentais relatam uma resistência temporária de cepas de *Schistosoma* ao PZQ (FALLON et al., 1994; LIANG et al., 2010).

O PZQ possui baixa eficácia na forma imatura do parasito (LAMBERTUCCI et al., 2004), podendo acarretar resultados insatisfatórios no tratamento em massa em áreas endêmicas devido a reinfecção, além disso, não é bem tolerado por todos os pacientes, sendo associado à alguns efeitos colaterais indevidos (CIOLI et al., 2014).

Mediante os problemas apresentados na terapêutica usando o PZQ, se torna necessária a busca por novos fármacos, que apresentem menores efeitos colaterais, e atividade sobre as fases de desenvolvimento do *Schistosoma*, e que seja bem tolerado por todos os pacientes. (SAYED et al., 2008).

A ascendência crescente da química medicinal vem dando importante suporte ao desenvolvimento tecnológico de novos quimioterápicos que apresentam maior seletividade ao agente invasor e com isso menos toxicidade ao hospedeiro. Nesse âmbito, os compostos heterocíclicos têm-se destacado como estruturas promissoras obtidas tanto por meio de síntese como a partir de produtos naturais.

Em um *screening* de moléculas realizado por Santiago et al (2014), derivados ftalil-tiazóis apresentaram atividade promissora contra o *S.mansoni*. Estes derivados são constituídos por dois importantes grupos farmacofóricos, a ftalimida e o tiazol.

Derivados de ftalimida são conhecidos pelas atividades imunomoduladoras, dentre essas se destaca a inibição da citocina TNF- α nos processos inflamatórios e tumorais (HASHIMOTO et al., 2002; KAWAI et a., 2013). Verificou-se, ainda, as atividades anti-angiogênica, anti-proliferativa, ativadora de apoptose, das células T e NK, inibidora de adesão celular entre outras (TEO et al., 2005; HASHIMOTO et al., 2002). Por sua vez derivados de tiazóis já são conhecidos na química medicinal, apresentando diversas atividades, como atividade antimicrobiana (BHARTI et al., 2010), anti-inflamatória (GIRI et al., 2008) e no tratamento contra tuberculose (SHIRADKAR et al., 2006).

Neste contexto, pretende-se avaliar o potencial terapêutico de novos derivados ftalil-tiazóis como candidatos a fármacos esquistossomicidas. Espera-se com isso contribuir para identificação de novos protótipos a fármacos esquistossomicidas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A esquistossomose é caracterizada como uma das principais infecções parasitárias de regiões tropicais, sendo uma doença que acomete principalmente áreas com baixo desenvolvimento social e econômico. Existem mais de 200 milhões de pessoas que vivem nas áreas endêmicas de 77 países em todo o mundo, o que representa um grande problema sanitário e econômico nas nações tropicais e em desenvolvimento (CROMPTON et al, 2010; GRAY et al, 2010)

A esquistossomose é uma doença causada por parasitos do gênero *Schistosoma* (Trematoda: Schistosomatidae). Existem seis espécies de *Schistosoma*, porém três delas apresentam grande relevância na saúde pública: *Schistosoma haematobium* que causa a esquistossomose urinária (BILHARTZ, 1852), *Schistosoma japonicum* e *Schistosoma mansoni* que causam a esquistossomose intestinal (KATSURADA, 1904; SAMBON, 1907).

No Brasil a espécie endêmica é o *S.mansoni*, tendo como hospedeiro intermediário o caramujo do gênero *Biomphalaria sp.* A esquistossomose intestinal causada pelo *S. mansoni* acomete cerca de 6 milhões de pessoas no Brasil, sua área endêmica mais importante está localizada em uma faixa ao longo do litoral, abrangendo os estados de Alagoas, Bahia, Paraíba, Pernambuco, Rio Grande do Norte e Sergipe na região Nordeste, Espírito Santo e Minas Gerais na região Sudeste (BARBOSA & GOMES, 2008; BRASIL, 2009).

Em Pernambuco, dos 185 municípios, 93 são endêmicos para esquistossomose, tornando o estado o 3º colocado em prevalência na região Nordeste (SILVA & DOMINGUES, 2011). Só em 2010 foram registrados em Pernambuco, 10.889 casos positivos de esquistossomose, representado 6,10% de positividade, com 205 óbitos. Em 2014 esse número de casos caiu para aproximadamente 7.000 com 175 óbitos (PERNAMBUCO, 2015).

2.1 Ciclo da esquistossomose mansônica

O ciclo evolutivo do *Schistosoma* é constituído por duas fases, uma fase assexuada que ocorre no hospedeiro intermediário, o caramujo *Biomphalaria*, e uma fase sexuada que ocorre no hospedeiro definitivo, homem ou outro vertebrado susceptível. As formas evolutivas do *S.mansoni* consistem em ovo, miracídio,

esporocistos, cercárias, esquistossômulos e verme adulto (Figura 1). Os vermes adultos normalmente habitam as vênulas do plexo hemorroidário inferior e as ramificações dos vasos mesentéricos, onde fazem a deposição de ovos no intestino (NEVES, 2011).

FIGURA 1: Fases evolutivas do *Schistosoma mansoni*.



FONTE: Imagem adaptada do Atlas acadêmico de parasitologia humana FCFRP-USP

LEGENDA: A- ovo de *S.mansoni* B- miracídio C- cercária D- vermes adultos.

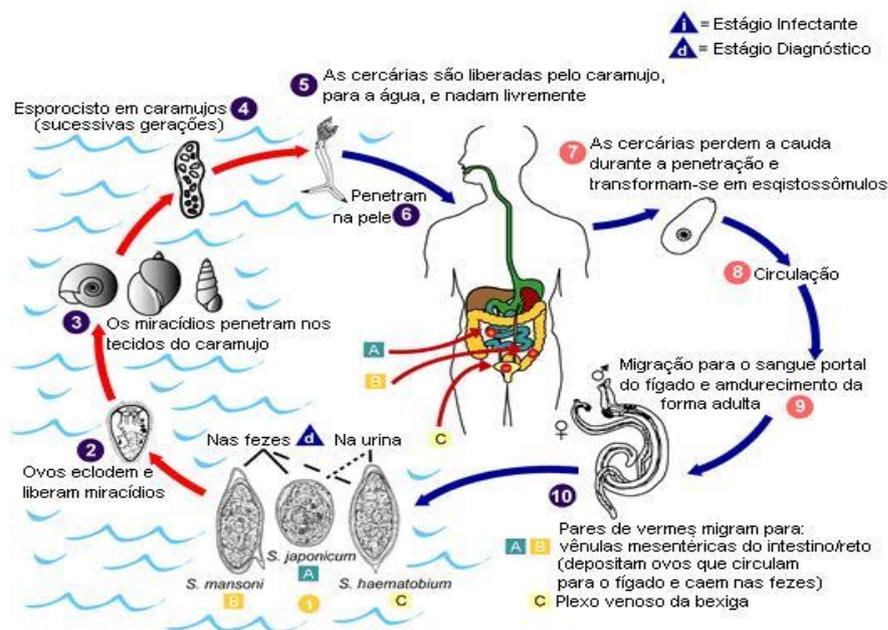
A transmissão da doença está relacionada com a contaminação de coleções hídricas por fezes contendo ovos de *S.mansoni* (Figura 2). Na presença de luminosidade, temperatura e oxigenação os ovos maduros eclodem, liberando o miracídio, larva ciliada, que nada em direção ao caramujo e o infectam. No caramujo, o miracídio sofre uma reorganização celular dando origem aos esporocistos, que passam por um processo de reprodução assexuada, e por fim originam as cercárias, forma infectante do hospedeiro vertebrado (CARVALHO, COELHO, LENZI, 2008).

Após serem liberadas pelos caramujos, as cercárias nadam ativamente até o encontro com o hospedeiro definitivo (CAFFREY, 2007; RAMIREZ et al., 2007), penetrando na pele através da ação lítica de enzimas e pela ação mecânica de seus movimentos. Ao penetrar na pele, as cercárias perdem a cauda e sofrem alterações morfológicas e bioquímicas e passam a se chamar de esquistossômulo (RAMIREZ et al., 2007; SAYED, 2008; HOLTFRETER et al., 2011). Os esquistossômulos penetram nos vasos sanguíneos e linfáticos dos hospedeiros vertebrados, sendo conduzidos ao pulmão de onde a maioria migra para o fígado, se alojando no sistema venoso portal hepático, onde atingem a maturidade sexual e se tornam

vermes adultos (SAYED, 2008; HOLTFRETER et al., 2011). O tempo de migração para o *S.mansoni* em seres humanos é normalmente de sete dias (ABDULLA et al., 2007).

Após o acasalamento os parasitos migram para as veias mesentéricas onde iniciam a oviposição no lúmen intestinal. O ciclo sexuado dura cerca de 49 dias, e vai desde a penetração da pele até a oviposição (ABDULLA et al., 2007; SAYED et al., 2008). Após a postura dos ovos, estes chegam à luz intestinal e são eliminados para o exterior pelas fezes, os ovos que não alcançam o lúmen intestinal são levados pela circulação e ficam presos na parede intestinal e no fígado, e são circundados por uma resposta granulomatosa do hospedeiro (ALMEIDA, 2009).

FIGURA 2: Ciclo de Vida do *Schistosoma sp.*



FONTE: DISSOUS & GREVELDING (2010)

LEGENDA: Ovos de *Schistosoma* eliminados na água; 2- Ovos eclodem e liberam o miracídio; 3- Os miracídeos infectam os caramujos; 4- Sucessivas gerações de esporocistos; 5- cercárias liberadas pelos caramujos; 6- cercárias penetram a pele; 7- transformação em esquistossômulo; 8- atingem a circulação; 9- migram para a o sistema porta e atingem a forma adulta; 10- Acasalamento e deposição dos ovos nas veias mesentéricas.

2.2 Patogenia da esquistossomose mansônica

A esquistossomose mansônica é uma doença decorrente da resposta inflamatória que ocorre em torno dos ovos dos parasitos que não são eliminados nas fezes, sendo assim, a carga parasitária e a resposta imunológica do paciente estão intimamente ligados com a gravidade da doença (WILSON et al., 2007). Após a oviposição alguns ovos podem se depositar no fígado e em outros tecidos, levando a formação de granulomas ao redor dos ovos, podem levar a oclusão do fluxo sanguíneo, causando fibrose do fígado e hipertensão portal (ABDULLA et al., 2007; BERTÃO et al., 2012).

A esquistossomose é classificada em duas fases, aguda e crônica, podendo a fase crônica apresentar três formas clínicas: intestinal, hepatointestinal e hepatoesplênica (REY, 2008). Na fase aguda, a primeira manifestação clínica pode aparecer logo após o contato com a cercária. O indivíduo pode apresentar a dermatite cercariana, caracterizada por "sensação de comichão", erupção urticariforme e é seguida, dentro de 24 horas, por eritema, edema pequeno, pápulas e dor (COON, 2005; NEVES, 2011).

A fase aguda apresenta uma sintomatologia característica, denominada de febre Katayama, que surge de três a sete semanas após a exposição, caracterizada por febre, anorexia, dor abdominal e cefaleia, diarreia, náuseas, vômitos e tosse seca (PORDEUS et al., 2008; BARBOSA et al., 2004). Essas manifestações clínicas geralmente são assintomáticas em moradores de áreas endêmicas, sendo a forma sintomática mais comum em indivíduos de áreas não endêmicas (HATZ, 2005; ALMEIDA, 2009). A fase aguda pode durar em média de 30-60 dias, desaparecendo no caso de tratamento do paciente, e podendo evoluir o quadro para fase crônica em indivíduos sem tratamento (LAMBERTUCCI, 2010).

Na forma crônica, predominam os sintomas decorrentes de hipertensão portal, caracteristicamente independente da ocorrência de lesão hepatocelular (SILVA et al, 2012). A fase crônica ocorre devido aos ovos que ficam presos nos tecidos que provocam uma reação inflamatória eosinofílica e granulomatosa, que leva a uma extensa fibrose nos espaços periportais, induzindo a Fibrose de Symers (CHEEVER et al, 2000; SALES et al, 2009; COUTO et al, 2008). Uma das consequências mais importantes da fibrose nos espaços periportais é criar dificuldade à passagem do sangue venoso através do fígado, causando uma hipertensão da veia porta e conseqüentemente acarretando uma congestão e edema da parede do estômago e

intestino, e um aumento de volume do baço (esplenomegalia). Isso acarreta no desenvolvendo da forma hepatoesplênica da doença (REY, 2008) (FIGURA 3).

A doença ainda pode levar acarretar lesões cardiopulmonares, glomerulonefrite, neurológicas e lesões no aparelho reprodutor masculino e feminino, podendo causar infertilidade (BARSOUM et al., 2004; LAMBERTUCCI et al., 2008; POGGENSEE, FELDMIEIER, 2001).

FIGURA 3: Forma hepatoesplênica da esquistossomose mansônica



FONTE: LAMBERTUCCI (2006)

Embora a maioria das pessoas apresentem quadros benignos (REY, 2008), a esquistossomose apresenta um elevado potencial de morbidade, que torna esta doença um grave problema de saúde pública. A doença está associada a manifestações crônicas e debilitantes, podendo levar o indivíduo a uma deficiência cognitiva, estafa e diminuição do crescimento (ABDULLA et al., 2007). Portanto se tornam imprescindíveis o controle e tratamento da doença, reduzindo a prevalência e mortalidade da infecção esquistossomótica.

2.3 Tratamento

O tratamento da esquistossomose se baseia na quimioterapia, utilizando drogas que se caracterizam por sua alta eficácia e baixo custo. O primeiro medicamento utilizado para o tratamento da esquistossomose foi o tártaro emético (tartarato de antimônio e potássio), administrado por via endovenosa durante um mês (CHRISTOPHERSON, 1918). Após a utilização do tártato ermético, outros

antimoniais foram introduzidos no uso clínico (KATZ & COELHO, 2008). Porém os derivados de antimoniais deixaram de ser usados no tratamento por ocasionarem inúmeros efeitos colaterais e tóxicos, em alguns casos levando pacientes à morte súbita (KATZ, 2008a).

Posteriormente, foram utilizados o cloridrato de 1-N-b-dietil-amino-etil-amino-4-metil-9-tioxantona, a lucantona e seu metabólito principal 1-N-b-dietil-aminoetil-amino-4-(hidroximetil)-9-tioxantona, a hicantona, que é eficaz, especificamente, contra o *S. mansoni* e o *S. haematobium* (SILVA K.E.R. et al, 2012). No entanto esses fármacos não são mais utilizados na terapia medicamentosa pela possibilidade de desenvolvimento de lesões hepáticas, renais, alucinações e outros efeitos adversos (KATZ & COELHO, 2008).

Em 1969, foi desenvolvida a oxamniquina, a primeira droga com alto percentual de cura da esquistossomose mansônica. Essa droga era administrada em dose única, por via oral, inicialmente bem tolerada pelos pacientes (RICHARDS & FOSTER, 1969). No entanto, estudos posteriores associaram a oxamniquina aos efeitos colaterais de sonolência, tontura, cefaleia, e em alguns casos raros, convulsões, tremores e arritmia cardíaca (CARVALHO et al., 1985; GUITTI et al., 1993), além disso a droga apresenta efeito apenas nas infecções causadas pelo *S.mansoni* (FERRARI et al., 2003).

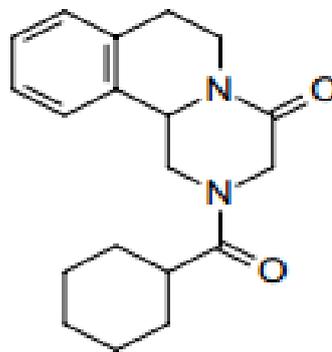
Em 1977, Thomas e Gönner descreveram a atividade do praziquantel contra cestódeos e trematódeos, apresentando uma excelente atividade esquistossomicida e boa tolerância pelos pacientes. O praziquantel foi o primeiro fármaco a apresentar atividade contra todas as espécies de *Schistosoma*, com taxas de cura das infecções esquistossomóticas entre 60% e 90%, e redução da contagem de ovos acima de 90% entre os não curados (KATZ, 2008b).

Atualmente no Brasil, o praziquantel e a oxamniquina têm sido os fármacos de indicados na quimioterapia contra a esquistossomose (BRASIL, 2014). No entanto, o fato da oxamniquina atuar apenas sobre o *S.mansoni*, fez com que o seu mercado se tornasse restrito, e a indústria farmacêutica detentora dos seus direitos limitasse a sua produção, dificultando uma redução de preço (CIOLI et al., 2014). Dessa forma, a oxamniquina perdeu mercado para o praziquantel, que se tornou o fármaco mais utilizado para controle da esquistossomose (MOURÃO, 2001). Em um estudo realizado por FERRARI et al. (2003) foi evidenciado que o praziquantel é

significativamente mais eficaz que a oxamniquine no tratamento da esquistossomose mansônica.

O praziquantel, conhecido estruturalmente como (2-ciclohexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino-(2,1- α)isoquinolina-4-ona) (FIGURA 4), apresenta-se como um pó branco, de sabor amargo, e com baixa disponibilidade para um fármaco de via oral, devido a sua alta lipossolubilidade (MOURÃO, 2005). Apesar de se apresentar como uma mistura racêmica, apenas a forma Levógiro é ativa contra o *Schistosoma* (DOENHOFF, 2009). Além disso, o enantiômero inativo, S-(+)-enantiômero, está associado aos efeitos colaterais do medicamento (WOELFLE et al., 2011).

FIGURA 4: molécula do praziquantel.



FONTE: ALBUQUERQUE (2002)

O praziquantel possui baixa frequência de efeitos colaterais severos, alta taxa de cura parasitológica para as três principais espécies de *Schistosoma sp.*, eficácia em dose única, administração oral, estabilidade química e baixo custo. Devido à essas vantagens, é considerado o fármaco de escolha para o uso em programas de tratamento em massa nas áreas endêmicas (KATZ, 2008a).

O mecanismo de ação do praziquantel ainda não foi completamente elucidado, no entanto, sabe-se que esse fármaco provoca um influxo de cálcio dentro do parasito, contração muscular, alterações morfológicas no tegumento e aumenta a exposição de antígenos na superfície do parasito (CIOLI et al., 1995; DOENHOFF et al., 2008).

Apesar de o praziquantel apresentar excelente atividade esquistossomicida, a droga tem pouco efeito sobre os ovos e formas imaturas do *Schistosoma*, o que

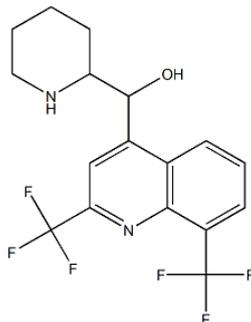
pode gerar baixa taxa de cura em áreas endêmicas (CAFFREY, 2007; CIOLI; PICAMATTOCCIA 2003). Alguns estudos demonstraram uma baixa taxa de cura em áreas com foco de esquistossomose, sugerindo que uma possível resistência ao fármaco possa ter contribuído para a baixa eficácia terapêutica (FALLON et al., 1995; STELMA et al., 1995; GUISSSE et al., 1997; ISMAIL et al., 1999). No entanto, a baixa atividade do praziquantel nessas áreas endêmicas pode ser atribuída também à reinfeccções rápidas, ausência de resposta imune da população e baixo percentual de maturação dos vermes (FALLON et al., 1996; CIOLI et al., 2014). Além disso, estudos experimentais evidenciaram uma possível resistência a droga (FALLON et al., 1994; LIANG et al., 2001).

Tendo em vista o desenvolvimento de possíveis mecanismos de resistência do *S.mansoni* ao praziquantel e sua baixa eficácia contra as formas imaturas do parasito, faz-se necessária a pesquisa e produção de novas drogas para prevenção e cura da esquistossomose (LESCANO et al., 2004; KEISER et al., 2009).

2.4 Perspectivas de novos fármacos

Devido a importância do desenvolvimento de novas drogas contra a esquistossomose, a busca por novos compostos no meio científico vem aumentando significativamente. O número de compostos que vêm sendo utilizados como possíveis agentes esquistossomicidas é vasto, dentre eles podemos destacar medicamentos com atividade antiparasitária comprovada (KEISER et al., 2009; ELISSA et al., 2011), os extratos de plantas (OLIVEIRA et al., 2014;) e os compostos heterocíclicos sintéticos (ABDULLA et al., 2007; SAYED et al., 2008; SANTIAGO et al., 2014)

Dentre os medicamentos antiparasitários podemos destacar a mefloquina (FIGURA 5), análogo sintético do quinina, como promissor agente esquistossomicida. Em um estudo in vivo, Keiser et al., (2009) evidenciaram que a mefloquina, apresentou atividade sobre a forma jovem e adulta do *S. mansoni* e *S. japonicum*, induzindo alterações morfológicas na membrana de esquistossômulos e vermes adultos. Além da mefloquina, o artemeter e a artemisina

FIGURA 5: Estrutura química da mefloquina

FONTE: KEISER et al. (2009)

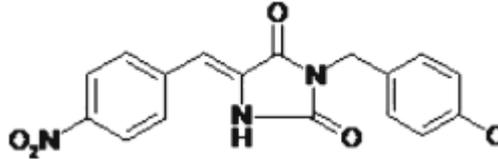
Outro antiparasitário bastante promissor na terapia da esquistossomose é a miltefosina. Em um estudo experimental, a miltefosina foi administrada por via oral durante cinco dias, resultando em uma significativa redução do número de vermes, sendo evidenciado danos no tegumento dos parasitos, além disso apresentou redução de granulomas e melhora na patologia hepática (ELISSA et al., 2011).

Uma abordagem viável na terapia experimental da esquistossomose, é a utilização de extratos de plantas. Em um estudo in vitro envolvendo extratos de plantas, foi demonstrada uma excelente atividade *anti-Schistosoma* da plumbalina e da sanguinarina, para ambos os compostos, uma baixa concentração resultou em 100% de mortalidade dos vermes. Cada composto provocou alterações morfológicas e tegumentares bem diferentes nos vermes mortos, sugerindo que possuem mecanismos de ação distintos (ZHANG E COULTAS, 2012).

Os compostos heterocíclicos vêm ganhando destaque na química medicinal, sendo bastante utilizados no estudo da atividade esquistossomicida. Dentre eles, as imidazolidinonas, oxadiazóis e análogos estruturais norteiam as investigações na busca de novas drogas que apresentem maior seletividade pelos alvos celulares do *S. mansoni* (MELO et al., 2006; NEVES et al., 2010; ALBUQUERQUE et al., 2005; SAYED et al., 2008). Derivados heterocíclicos pentagonais imidazolodionicos vêm sendo sintetizados e avaliados (PITTA et al., 2006), como o 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4) (FIGURA 6), que apresentou importante atividade esquistossomicida em estudos in vitro (SILVA K.E.R. et al., 2012). Em outro estudo, Sayed et al. (2008) identificaram uma nova classe de

compostos, oxadiazol, que apresentou atividade contra as formas jovem e adulta das principais espécies infectantes de esquistossomose para os seres humanos.

FIGURA 6: Estrutura química do 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (LPSF/FZ4).



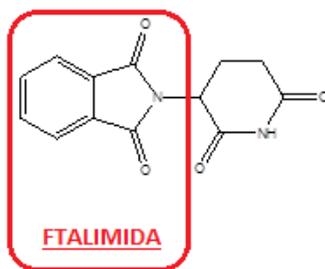
FONTE: GUEDES et al.(2011)

Em um novo estudo envolvendo derivados heterocíclicos, Santiago et al., (2014), demonstram um importante atividade de derivados ftalil-tiazóis, como o 2-(2-(2-(4-(4-methoxyphenyl)thiazol-2-yl)hydrazono)ethyl)isoindoline-1,3-dione, que além de demonstrar 100% de mortalidade do *S.mansoni* na forma adulta, também causou sérios danos no tegumento do parasito em um período de 24 e 48h de exposição. Os ftali-tiazóis são compostos constituídos por dois grupos farmacofóricos importantes, a ftalimida e o tiazol.

2.5 Ftalimida

Análogos estruturais da talidomida, as ftalimidas se configuram com um dos núcleos heterocíclicos que constituem a talidomida (FIGURA 7). A talidomida foi inserida no mercado no ano de 1957 por Chemie-Grunenthal como sedativo e foi amplamente comercializada pelo mundo até o ano de 1961. Entre 1961 e 1962 foi retirada do mercado devido a seu caráter teratogênico, sendo associada a mutações encontradas em crianças. No total mais de 10 mil crianças nasceram com graves problemas em todo o mundo (MELLIN, KATZENSTEIN, 1996; VARGESSON, 2013).

FIGURA 7: Núcleo heterocíclico da ftalimida na molécula da talidomida.



FONTE: O AUTOR

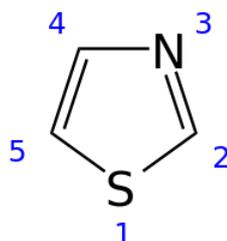
Em 1998 a talidomida retornou ao mercado, sendo aprovada pela FDA (Food and Drug Administration) para emprego no tratamento de manifestações cutâneas de eritema nodoso, hanseníase (COLLIN et al., 2001; HASHIMOTO, 2002). Atualmente, esse fármaco e seus análogos são utilizados para tratar uma série de outras condições, incluindo doenças autoimunes, como Lupus eritematoso e artrite reumatoide, além de tumor na medula óssea e outros tipos de câncer (TEO et al., 2004; VARGESSON, 2013).

Os mecanismos de ação da talidomida ainda não foram bem elucidados. No entanto, são bem descritas as suas propriedades de modular a resposta imune e de inibição do processo angiogênico, sendo também relatada com reguladora da produção de várias citocinas como TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-12 (COELHO, 2010; HASHIMOTO, 2002). Alguns estudos destacam que a propriedade imunomoduladora da talidomida está relacionada ao anel ftalimidico, sendo a modulação do TNF- α a mais pronunciada (MULLER et al., 1999; PESSOA et al., 2010; MACHADO et al., 2005; LIMA et al. 2006).

2.6 Tiazóis

O tiazol é um composto heterocíclico, formado por um anel de cinco membros contendo dois heteroátomos, um átomo de nitrogênio e um átomo de enxofre. Esse anel de tiazol é encontrado naturalmente na vitamina essencial B1 (Tiamina). Se apresenta como um líquido de aspecto límpido ou amarelo claro pálido, possuindo moderada solubilidade em meio aquoso e boa solubilidade em álcool e éter (SIDDIQUI et al., 2009).

FIGURA 8: molécula do tiazol.



FONTE: O AUTOR.

O tiazol vem demonstrando um papel importante na química medicinal ao longo dos anos, revelando atividades biológicas interessantes. Derivados de tiazóis já foram encontrados em medicamentos com aplicações no tratamento de alergias (HARGRAVE et al., 1983), hipertensão (PATT et al., 1992) e inflamação (SHARMA et al., 2009; GIRI et al., 2008), ainda apresentando uma atividade antitrombótica (BARDOC et al., 1997). Além disso foram utilizados para preparar várias drogas com importante atividade antimicrobiana, antifúngica, e no tratamento contra tuberculose (BHARTI et al, 2010; SHIRADKAR et al, 2006). Um derivado do tiazol, o 9-acridona-hidrazona-tiazol, demonstrou ser efetivo contra o *S.mansoni* na fase de esquistossômulo, eliminando todos os parasitos 24h após a penetração das cercárias (PEREIRA et al., 1995).

3. JUSTIFICATIVA

No Brasil, existem duas drogas disponíveis para o tratamento da esquistossomose mansônica: oxamniquine e praziquantel. Os dois medicamentos possuem eficácia comprovada contra o *S.mansoni*. No entanto, o praziquantel é a droga de escolha, em função dos menores efeitos colaterais apresentados pelos indivíduos após tratamento, a sua disponibilidade no mercado e ao seu baixo custo. Embora não seja adequada, a estratégia atual de controle da esquistossomose mansônica é baseada principalmente na quimioterapia. É importante ressaltar que em algumas áreas endêmicas a droga já demonstrou baixa eficácia, sendo discutida a possibilidade de desenvolvimento de resistência ao medicamento.

Diante de tal problemática torna-se importante o desenvolvimento de novos fármacos como alternativa na terapia da esquistossomose que sejam mais seguros e eficientes na atividade equistossomicida, possuindo ao mesmo tempo, uma menor taxa de efeitos colaterais e um baixo custo, tornando-se acessível à população. Baseando-se nessa necessidade, este estudo teve por finalidade realizar uma triagem com os compostos ftalil-tiazóis inéditos, a fim de torná-los possíveis candidatos à fármacos para a terapia da esquistossomose mansônica.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico de novas moléculas ftalil-tiazóis na esquistossomose experimental.

4.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a citotoxicidade dos compostos;
- b) Avaliar in vitro a atividade das moléculas frente a forma adulta do *S. mansoni*;
- c) Avaliar as alterações ultraestruturais induzidas pelos compostos no verme adulto do *S. mansoni*;
- d) Determinar a eficácia do tratamento com os compostos estudados na esquistossomose experimental.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Moléculas

Com base nos ftalil-tiazóis utilizados por Santiago et al, (2014), foram selecionados novos protótipos ftalil-tiazóis. Os compostos 2-(4-feniltiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (AS-02) 2-(4-p-tolultiazol-2 ilamino)isoindolino-1,3-diona (AS-03), 2-(4-(4-metoxifenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (AS-04), 2-(4-(4-nitrofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (AS-08), 2-(4-(bifenil-4-il)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (AS-09), 2-(4-(naftalen-2-il)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (AS-10) foram fornecidos pelo laboratório de planejamento e química medicinal LpQM/UFPE. (**APÊNDICE A**)

5.2 Ensaio de citotoxicidade

Para a determinação da citotoxicidade foram utilizados esplenócitos de camundongos albinos da linhagem BALB/c (fêmeas entre 6-8 semanas) que foram fornecidos pelo biotério do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM, Recife, Brasil). Os animais foram mantidos em gaiolas esterilizadas, e receberam alimentação e água à vontade.

As células esplênicas foram obtidas de acordo com Pereira *et al.* (2005). Após eutanásia do animal utilizando CO₂, o baço de cada camundongo foi removido em condições assépticas e, em fluxo vertical, macerado em placa de Petri contendo meio de cultura RPMI. As suspensões celulares obtidas foram centrifugadas a 4°C, durante 5 minutos. Após descarte do sobrenadante, adicionou-se água destilada ao sedimento promovendo lise das hemácias. Após o período de 5 minutos, o sobrenadante foi coletado e centrifugou-se novamente a 4°C, 200 x g por cinco minutos. O sedimento (contendo as células esplênicas) foi ressuspendido em meio RPMI 1640 e uma alíquota de cada suspensão celular removida, diluída 1:10 em azul de trypan e quantificada em câmara de Neubauer para se verificar as células viáveis.

As células esplênicas (6×10^5 células/poço) obtidas anteriormente foram cultivadas em placas de 96 poços de fundo plano, contendo meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino. Para o ensaio de citotoxicidade, as células foram incubadas com os compostos em sete diferentes concentrações (faixa de 200 a 0,1

µg/mL) e com 1 µM de timidina tritiada/poço durante 72 h em estufa de CO₂ a 37°C. Em paralelo, foram feitos controles com células tratadas com saponina (0,05%), com células tratadas com DMSO (0,05%), substâncias com reconhecida atividade tóxica e um controle sem tratamento. Após 72 h de incubação, as células foram coletadas em papel de fibra de vidro e, posteriormente, a captação de timidina tritiada foi determinada através do contador beta de cintilação. O percentual de citotoxicidade foi determinado comparando-se a percentagem de incorporação de timidina tritiada nos poços com as drogas em relação aos poços não tratados.

5.3 Infecção pelo *S. mansoni*.

A infecção foi realizada por via percutânea após recebimento dos animais com 25-30 dias de idade. Após recebimento dos animais, os camundongos albinos suíços (**ANEXO A**) foram submetidos à infecção experimental, utilizando para cada camundongo cerca de 120 cercárias para o estudo *in vitro*. Para o estudo *in vivo*, os camundongos foram infectados com 80 cercárias (fase aguda). As cercárias utilizadas são da Cepa LE – Belo Horizonte oriundas de *Biomphalaria glabrata* criados em laboratório de malacologia (CPqAM).

Para realizar a infecção os animais são colocados em um recipiente contendo uma quantidade mínima de água morna, para que eles eliminem fezes e urina. Em seguida, os animais foram colocados em frascos de vidro individuais de boca larga, com tampas aeradas (furadas), contendo água que cubra as patas e a cauda. Foram adicionados, então, os inóculos previamente ajustados dentro dos frascos onde estão os camundongos, ficando os animais em contato com o inóculo em torno de 1h, sob fonte de luz direta, facilitando a penetração do patógeno.

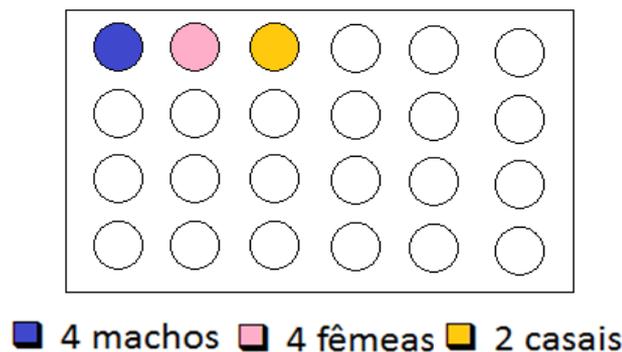
Após 45 dias de infecção dos camundongos, foram realizados exames parasitológicos das fezes para avaliar a positividade da infecção (HOFFMAN et al, 1934).

5.4 Avaliação da suscetibilidade *in vitro* de vermes adultos de *S. mansoni* frente aos compostos ftalil-tiazóis.

Foi realizada uma seleção que serviu para eleger compostos promissores. A proposta desse projeto foi avaliar seis compostos em duplicata. O animal será submetido à anestesia antes do procedimento. Os animais serão anestesiados por

via intraperitoneal (IP) com Cloridrato de Ketamina (100-200 mg/Kg) associada a Cloridrato de Xilasina (5-16 mg/Kg). Após ausência de reflexo do animal foi realizada, então, uma incisão próxima aos órgãos genitais indo até a caixa torácica com o auxílio de uma tesoura oftálmica (fina/fina) + pinça de dissecação. Corta-se a veia portal e perfunde-se o ventrículo esquerdo com solução de perfusão (NaCl 0,85% e Citrato de Sódio 0,015%), para retirada dos vermes das veias mesentéricas. Os parasitos foram removidos dos camundongos infectados com alta carga parasitária (120 cercárias), e em seguida lavados em meio RPMI-1640 completo. Após a lavagem os vermes foram transferidos para placas de cultura de tecidos contendo 2mL desse meio. Cada poço recebeu quatro vermes, utilizando os sistemas descritos na figura, e em seguida foram incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após um período de 2 horas de adaptação, os derivados sintetizados foram adicionados nas concentrações de 100 µg/mL, 80µg/mL, 40 µg/mL, 20 µg/mL, 10 µg/mL e 5 µg/mL. Os parasitos serão mantidos em cultura por seis dias sendo monitorados a cada 24 horas para avaliação da atividade motora, oviposição e da taxa de mortalidade.

FIGURA 9: Esquema de plaqueamento utilizado nos ensaios in vitro. Quatro vermes machos no poço azul; quatro vermes fêmeas no poço rosa e dois casais de vermes no poço amarelo.



FONTE: O AUTOR

5.5 Microscopia eletrônica de varredura de vermes adultos tratados com os derivados ftalil-tiazóis.

Os compostos que obtiveram atividade esquistossomicida significativa foram incubados com vermes adultos para um novo ensaio in vitro, onde foram avaliados quanto as alterações ultraestruturais causadas nos parasitos. Para isso os vermes tratados com os compostos foram coletados com 2h e 22h após a incubação.

Foram fixados overnight à temperatura ambiente com 2,5% de glutaraldeído, formaldeído a 4%, e tampão de cacodilato 0,1 M com pH 6,8. Eles foram, em seguida, pós-fixados em 2% de tetróxido de ósmio (OsO₄) num tampão de cacodilato 0,1 M com pH 6,8 durante 60 min na ausência da luz à temperatura ambiente. Os próximos passos foram o de lavagem e desidratação em uma série de etanol graduada por quinze minutos cada. A secagem do material foi realizada no ponto crítico, utilizando CO₂ líquido. Os vermes foram revestidos com ouro coloidal examinados no microscópio de varredura JEOL-5600LV.

5.6 Avaliação da suscetibilidade in vivo de vermes adultos de *S. mansoni* frente aos compostos ftalil-tiazóis.

O composto AS-09 foi selecionado para a terapia experimental da esquistossomose mansônica devido sua alta efetividade nos ensaios in vitro. Devido ao composto possuir baixa solubilidade em meio aquoso, antes do tratamento dos camundongos com 60 dias de infecção, foi realizada uma preparação utilizando Chremophor EL a 15% para tentar aumentar a biodisponibilidade do composto AS-09.

Fase Aguda: composto por **40** camundongos machos submetidos à infecção experimental pelo *S. mansoni* (80 cercárias). Após 45 dias da infecção foram avaliados quanto a positividade da infecção através do método de HOFFMAN et al. e divididos em cinco grupos:

- a) Grupo tratado apenas com o veículo utilizado para solubilizar a droga por via intraperitoneal (10 animais)
- b) Grupo tratado com o derivado ftalil-tiazol na dose de 400 mg/Kg por via intraperitoneal (10 animais)
- c) Grupo tratado apenas com o veículo utilizado para solubilizar a droga por via oral (10 animais)
- d) Grupo tratado com o derivado ftalil-tiazol na dose de 400 mg/Kg por via oral (10 animais)

- e) Grupo tratado com o praziquantel na dose de 200mg/kg por via oral (10 animais). O PZQ utilizado foi a cedido pelo Hospital das Clínicas de Pernambuco (HC-PE), com **validade até 03/17**.

Todos os camundongos foram mantidos no Biotério de Experimentação do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ), em condições padronizadas de temperatura (23°C), exaustão de ar e luminosidade, recebendo água e alimentação *ad libitum* com dieta padrão comercial para camundongos (NuvilabCR1, Nuvital, Curitiba, PR). Após 60 dias (fase aguda) de infecção, a droga preparada na solução de Chremophor a 15% foi administrada por via intraperitoneal e oro-gástrica através da gavagem durante cinco dias. Após o procedimento, os animais serão recolocados em suas respectivas caixas e monitorados durante todo o período de duração do experimento. Após 15 dias do tratamento dos compostos, os animais serão eutanasiados para a determinação do número de vermes residuais e coleta de fragmentos de tecidos para avaliação parasitológica.

5.7 Avaliação parasitológica

5.7.1 Obtenção e contagem dos vermes adultos

Os parasitos serão obtidos e contabilizados através de perfusão do sistema porta-mesentérico e coleta direta no mesentério; descrito no item 5.4.

5.7.2 Oograma

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

5.7.3 Contagem dos ovos do fígado e no intestino

Fragmentos de fígado e do intestino foram retirados e digeridos em hidróxido de potássio (KOH) a 4% (CHEEVER et al, 1970). Os ovos encontrados foram quantificados com o auxílio da câmara de contagem de células “Sedgewick Rafter” (Graticules Limited: modelo S50, Tonbridge - England).

5.8.4 Determinação da eficácia do tratamento

A avaliação das moléculas e do praziquantel será determinada através da redução da percentagem da carga parasitária em cada grupo tratado utilizando a seguinte equação: Redução de vermes (%) = $(C-T)/C \times 100$, onde C é a quantidade de vermes recuperados no grupo controle e T é a quantidade de vermes recuperados do grupo tratado.

5.8 Análise estatística

Para análises comparativas das variáveis quantitativas, foram aplicados o teste *t* de Student para amostras independentes ou o teste de Análise de Variância (ANOVA). Para testar os contrastes no teste de Análise de Variância, foi aplicado um pós-teste. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%. Os softwares utilizados foram o Action Stat e o Graph Pad Prism 5.0.3.

5.9 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM). Protocolado sob nº 67/2014. **(ANEXO A)**

6. RESULTADOS

6.1 Determinação da citotoxicidade em esplenócitos de camundongos.

Buscando uma seletividade para o uso dos derivados ftalimidicos estudados, avaliou-se a citotoxicidade destes em ensaios com células de mamíferos. Para tal finalidade foi determinada a viabilidade celular destes compostos sobre esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c. As células foram incubadas na presença dos compostos por 24 horas. As concentrações dos compostos foram variadas, estabelecendo assim margens aproximadas de segurança quanto a sua concentração não-tóxica, em $\mu\text{g/mL}$.

TABELA 1: Avaliação da citotoxicidade em esplenócitos para a série de ftalil-tiazóis.

COMPOSTO	CITOTOXICIDADE ($\mu\text{g/mL}$) ^[a]
AS-02	1
AS-03	5
AS-04	5
AS-08	1
AS-09	>100
AS-10	>100
PZQ	<1

[a] Maior concentração atóxica (sem efeitos na viabilidade celular). Valores determinados após 24 horas de incubação na presença dos compostos

A tabela 1 apresenta os resultados da avaliação da citotoxicidade in vitro sobre esplenócitos de camundongos da linhagem BALB/c para os ftalil-tiazóis AS-02, AS-03, AS-04, AS-08, AS-09 e AS-10. Todos os compostos se mostraram menos tóxicos que o praziquantel para células esplênicas. Os compostos que apresentaram baixa citotoxicidade foram aqueles que apresentaram substituintes mais volumosos como bi-fenil (As-09) e 2-naftil (As-10). Em relação aos demais componentes estudados, estes dois compostos mostraram baixa citotoxicidade para esplenócitos

de camundongos, sendo estas células viáveis até quando cultivadas em presença de concentrações superiores a 100 µg/mL.

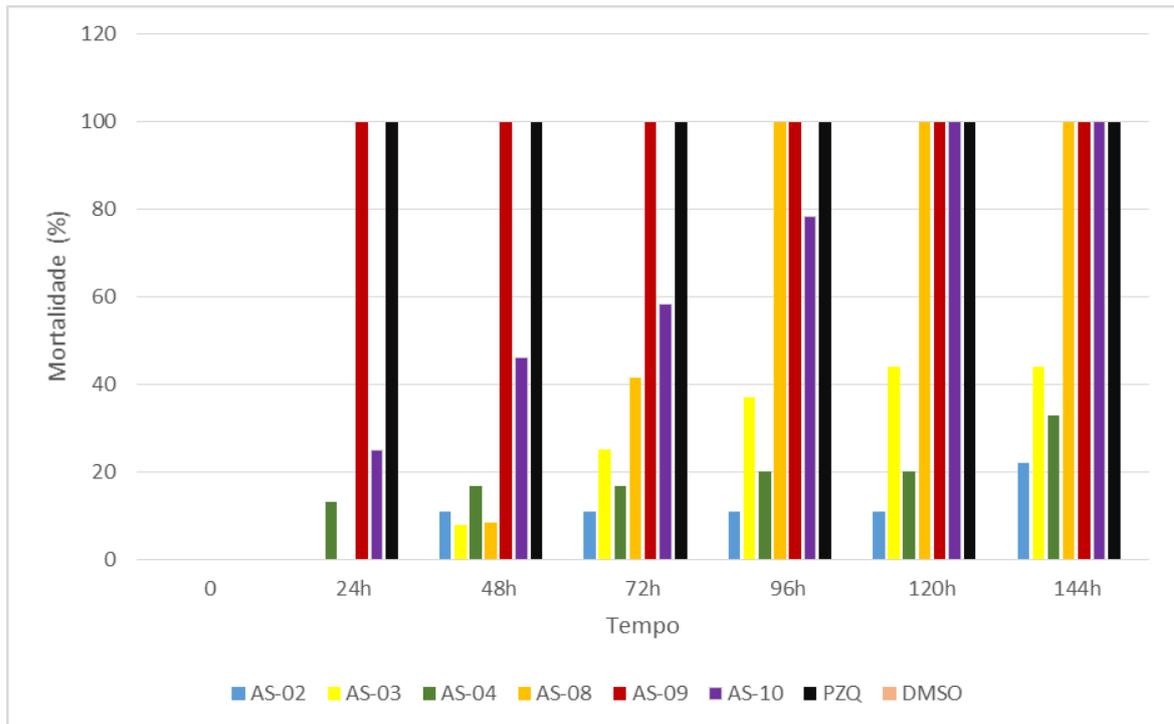
6.2 Efeito esquistossomicida dos derivados ftalil-tiazóis na concentração de 100 µg/mL sobre vermes adultos de *S. mansoni*.

Os derivados ftalil-tiazóis AS-02, AS-03, AS-04, AS-08, AS-09 e AS-10 foram avaliados com relação a sua atividade esquistossomicida. As referidas moléculas foram submetidas a um ensaio com vermes adultos de *S.mansoni* na concentração de 100 µg/mL, onde foram avaliadas motilidade, mortalidade e alterações no tegumento dos vermes expostos aos compostos. Este ensaio serviu para selecionar os compostos que demonstraram atividade esquistossomicida significativa. Tais compostos foram avaliados em seis diferentes concentrações, 5, 10, 20, 40, 80 e 100µg/mL.

O gráfico 1 demonstra uma comparação entre as seis moléculas avaliadas na dose de 100 µg/mL, O PZQ na dose de 3 µg/mL e o controle negativo utilizando DMSO. Foi evidenciado que os compostos AS-08, AS-09 e o AS-10 apresentaram melhor atividade em relação aos demais compostos, obtendo 100% de eficácia sobre os vermes adultos, sendo o derivado AS-09 o composto que demonstrou resultado mais promissor, obtendo mortalidade total dos parasitos dentro das primeiras 24h de observação.

As drogas AS-02, AS-03 e AS-04 não apresentaram atividade esquistossomicida expressiva, no entanto, foram observados alguns efeitos causados por essas drogas, como inibição da oviposição e separação dos casais. O PZQ ocasionou 100% de mortalidade dentro das primeiras 24h e no poço controle negativo (DMSO) os vermes permaneceram ativos até o último tempo do experimento.

FÍGURA 10: Efeito dos derivados ftalil-tiazóis na mortalidade de *S. mansoni* em teste in vitro na concentração de 100µg/mL.



FONTE: O AUTOR

6.3 Efeito dos candidatos ftalil-tiazóis nas concentrações de 5 a 100 µg/mL.

Os derivados que obtiveram atividade esquistossomicida maior que 50% no ensaio anterior foram avaliados utilizando um gradiente de concentrações, sendo analisados quanto as alterações na motilidade, no tegumento e na oviposição.

TABELA 2: Efeito in vitro dos derivados ftalil-tiazóis contra vermes adultos de *S.mansoni* nas concentrações de 5 a 100 µg/mL.

(Continua)

Molécula	Tempo	Mortalidade (%) na concentração (µg.mL ⁻¹) indicada					
		100	80	40	20	10	5
AS-08	24 h	0	0	0	0	0	0
	48 h	8,35	0	0	0	0	0
	72 h	41,65	8	0	0	0	0
	96 h	100	58	0	0	0	0
	120 h	100	100	0	0	0	0
	144 h	100	100	16,7	0	0	0

(Conclusão)

Molécula	Tempo	Mortalidade (%) na concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) indicada					
		100	80	40	20	10	5
AS-09	24 h	100	100	25	0	0	0
	48 h	100	100	41,7	8	0	0
	72 h	100	100	69,5	8	8	0
	96 h	100	100	79	16,7	16,7	8
	120 h	100	100	100	50	25	8
	144 h	100	100	100	50	25	8
AS-10	24 h	0	0	0	0	0	0
	48 h	25	25	8,35	0	0	0
	72 h	46	50	16,5	16,7	25	8
	96 h	58,5	50	55,35	16,7	33	16,7
	120 h	78,5	83	81	33	33	16,7
	144 h	100	100	100	44	33	16,7

Os compostos AS-08, AS-09 e o AS-10 foram avaliados nas concentrações de 5, 10, 20, 40, 80 e 100 $\mu\text{g/mL}$ a fim de identificar a menor concentração eficaz. A tabela 2 demonstra que o composto AS-09 apresentou atividade similar nas concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 80 $\mu\text{g/mL}$, causando 100% de mortalidade nas primeiras 24h, demonstrando também 100% de eficácia na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$ em seis dias de incubação. O composto AS-08 apresentou 100% de mortalidade na concentração de 80 $\mu\text{g/mL}$, no entanto, não mostrou atividade esquistossomicida expressiva em concentrações menores. O derivado AS-10 demonstrou 100% de eficácia em concentrações menores, atingindo mortalidade total dos parasitos na concentração de 40 $\mu\text{g/mL}$.

Na tabela 3 pode-se observar uma redução significativa da motilidade dos vermes expostos aos compostos AS-08, AS-09 e AS-10 com 120h de exposição. As alterações na atividade motora foram classificadas seguindo os seguintes critérios: 3 para os vermes ativos; 2 para redução mínima na motilidade; 1 para redução

significativa na motilidade, apenas com movimento cefálico e 0 para ausência de motilidade. Esses critérios foram estabelecidos de acordo com Ramirez et al, (2007).

O composto AS-08 só apresentou alterações significativas na motilidade nas concentrações de 80 e 100 µg/mL, além disso não inibiu a oviposição em concentrações mais baixas. Os derivados AS-09 e AS-10 por sua vez, mesmo em concentrações mais baixas causaram redução na motilidade dos vermes adultos de *S.mansoni*, mostrando atividade nas concentrações mínimas de 10 e 20 µg/mL respectivamente (TABELA 3). Os vermes tratados com os derivados AS-09 e AS-10 apresentaram descamação no tegumento e presença de bolhas mesmo na concentração mais baixa de 5 µg/mL. Além disso inibiram totalmente a oviposição dos vermes em todas as concentrações utilizadas.

TABELA 3: Escala de motilidade dos vermes controle e tratados com PZQ e com os derivados ftalil-tiazóis.

(Continua)

Grupos	Concentração	Motilidade (%)*				Alteração no tegumento	Oviposição*
		0	1	2	3		
Controle	***	0	0	0	100	Não	Sim
PZQ	3µg/mL	100	0	0	0	Sim	Não
AS-08	100 µg/mL	100	0	0	0	Sim	Não
	80 µg/ml	100	0	0	0	Sim	Não
	40 µg/mL	0	0	25	75	Não	Não
	20 µg/mL	0	0	0	100	Não	Sim
	10 µg/mL	0	0	0	100	Não	Sim
	5 µg/mL	0	0	0	100	Não	Sim

Grupos	Concentração	Motilidade (%) [*]				Alteração no tegumento	(Conclusão)
		0	1	2	3		Oviposição [*]
AS-09	100 µg/mL	100	0	0	0	Sim	Não
	80 µg/ml	100	0	0	0	Sim	Não
	40 µg/mL	100	0	0	0	Sim	Não
	20 µg/mL	50	50	0	0	Sim	Não
	10 µg/mL	25	33	42	0	Sim	Não
	5 µg/mL	8,3	16,7	0	75	Sim	Não
AS-10	100 µg/mL	100	0	0	0	Sim	Não
	80 µg/ml	100	0	0	0	Sim	Não
	40 µg/mL	100	0	0	0	Sim	Não
	20 µg/mL	7	5	0	0	Sim	Não
	10 µg/mL	42	33	0	25	Sim	Não
	5 µg/mL	16,7	16,7	50	16,6	Sim	Não

*Classificação da motilidade dos vermes: 0: ausência de motilidade; 1: redução significativa da motilidade, com apenas movimento de cabeça; 2: redução mínima de motilidade; 3: atividade normal.

6.4. Alterações ultraestruturais induzidas pelos compostos AS-09 e AS-10 em vermes adultos de *S.mansoni*.

Os derivados AS-09 e AS-10 foram selecionados para avaliação ultraestrutural de sua atividade sobre ao verme adulto do *S.mansoni*. Para este estudo foi realizado um novo ensaio in vitro, onde vermes adultos de *S.mansoni* foram incubados com os compostos AS-09 e AS-10 na concentração de 100µg/mL seguindo o protocolo descrito no item 5.4. Os vermes tratados com os compostos foram avaliados quanto as alterações ultraestruturais induzidas pelos compostos AS-09 e AS-10 nos tempos de 2h e 22h. Como controle negativo foram utilizados

vermes tratados com DMSO a 1,66%, avaliado no tempo de 22h, e como controle positivo vermes incubados com PZQ na concentração de 3 µg/mL por 2h.

Na figura 11 pode se observar a imagem de vermes tratados com o controle DMSO (FIGURA 11A a 11D), onde pode ser observado fêmeas de *S.mansoni* com toda a extensão do tegumento sem nenhuma alteração (FIGURA 11A) e em outra em maior aumento com o tegumento e papilas sensoriais íntegros (FIGURA 11B) e machos mostrando toda extensão do tegumento íntegro (FIGURA 11C) e em maior aumento mostrando tubérculos e espículos sem nenhuma alteração (FIGURA 11D). Os vermes tratados com o PZQ demonstraram as alterações características causadas pela droga, como contração total e enrugamento das fêmeas (FIGURA 11E e 11F), e nos machos destruição de tegumento e tubérculos, presença de bolhas e ulcerações (FIGURA 11H), e assim como na fêmea também provoca contração total do parasito (FIGURA 11E).

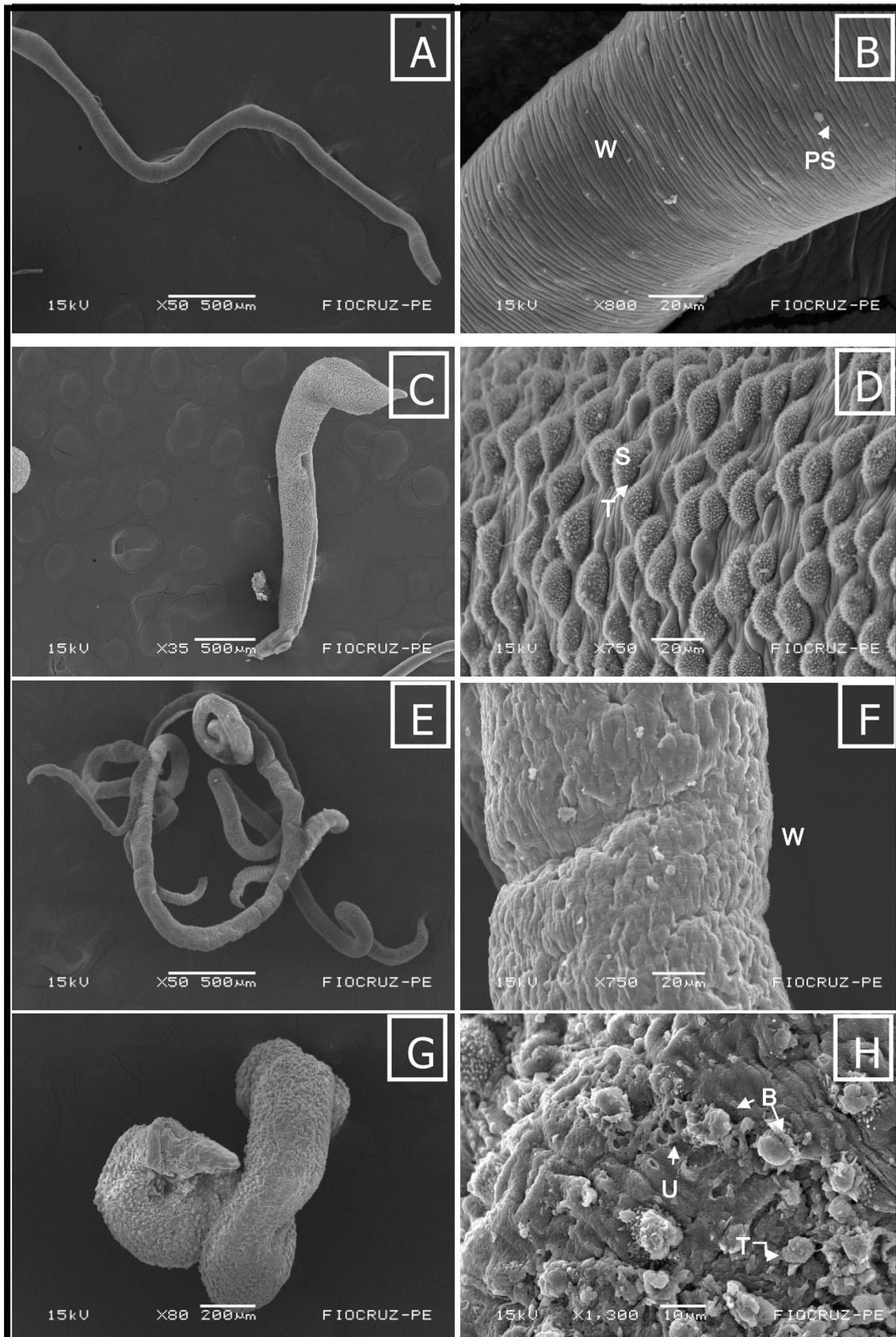


FIGURA 11: MEV de vermes adultos de *S. mansoni* após 22h de incubação com DMSO (A-D) e 2h com PZQ (E-H). A e B: mostram fêmeas de *S. mansoni* com o tegumento (W) e papilas sensoriais (PS) intactos. C e D: vermes machos sem alterações no tegumento, tubérculos (T) e espículos (S). E e F: fêmeas mortas com o tegumento enrugado (W). G e H: Vermes machos contorcidos, com presença de bolhas (B), ulcerações (U) e destruição dos tubérculos (T)

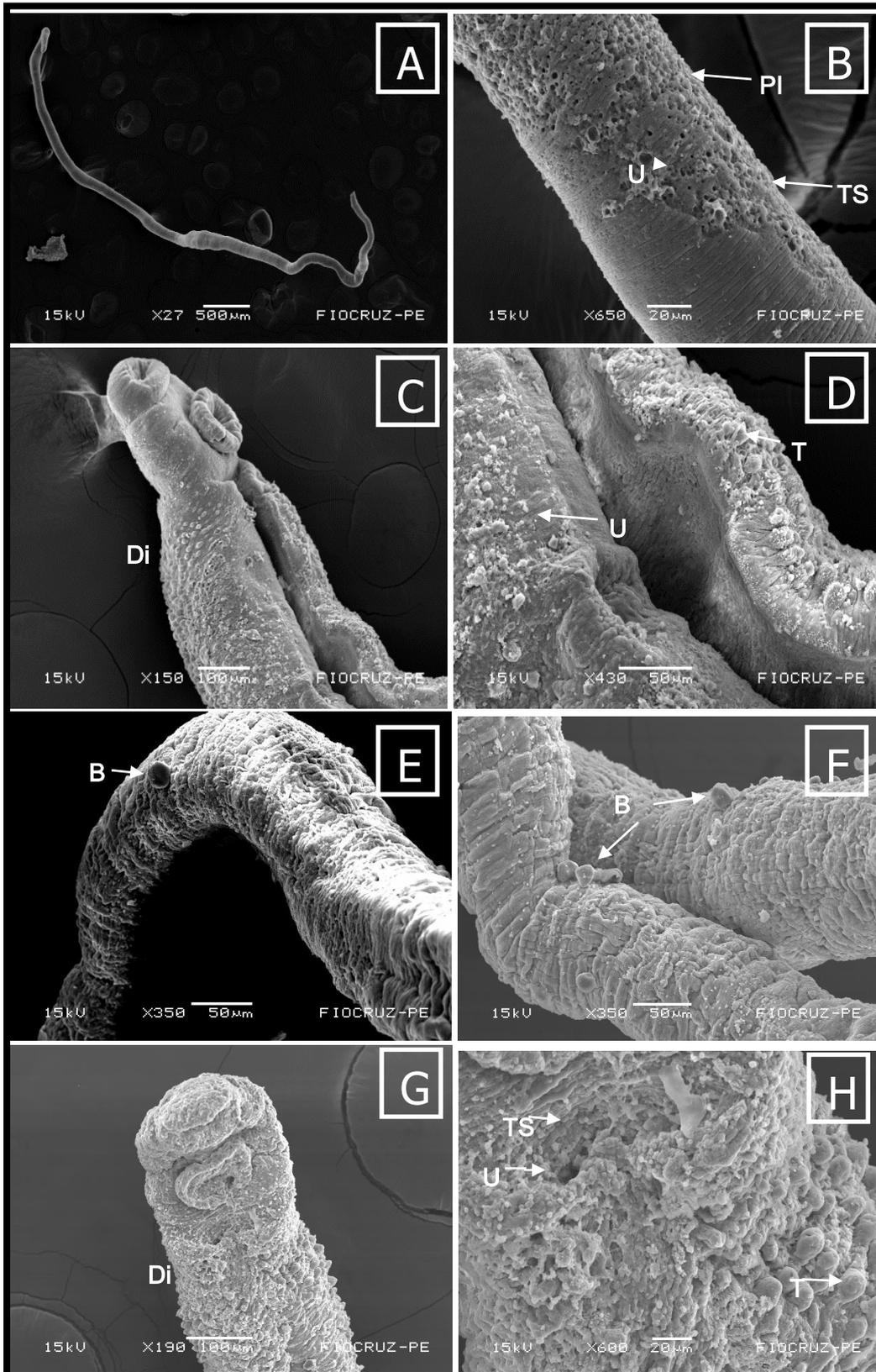


FIGURA 1210: MEV de vermes adultos de *S. mansoni* após 2h AS-09 (A-D) e 22h (E-H) de incubação com o composto AS-09. A e B: mostram fêmeas de *S.mansoni* com descamação do tegumento (PI), exposição do epitélio subtegumentar (TS) e ulcerações (U). C e D: machos com desintegração do tegumento (Di), tubérculos (T) destruídos e ulcerações (U)). E e F: fêmeas mortas com o tegumento enrugado e bolhas (B). G e H: machos com desintegração do tegumento (Di), exposição do epitélio subtegumentar, tubérculos (T) destruídos sem espículos e ulcerações (U).

As alterações causadas pelo composto AS-09 nos tempos de 2h e 22h podem ser observadas na figura 12. O derivado AS-09 foi capaz de induzir danos no já intervalo de tempo de duas horas, causando ulcerações e destruindo o tegumento a ponto de expor o epitélio subtegumentar das fêmeas (FIGURA 12A e B) e induzir a formação de bolhas, causar ulcerações e destruição parcial dos tubérculos nos machos (FIGURA 12C e 12D). No intervalo de 22h foi evidenciada a mortalidade total dos parasitos tratados com o composto AS-09, e as alterações encontradas nos vermes foram ainda mais severas. As fêmeas se encontravam enrugadas e foi evidenciada a presença de uma grande quantidade de bolhas de tamanho maior que no tempo de 2h (FIGURA 12E e 12F). Nos machos os danos foram ainda mais severos com desintegração de tegumento com exposição do epitélio subtegumentar, destruição de tubérculos e espículos, e presença de ulcerações (FIGURA 12G e 12H).

Diferente do composto AS-09, o derivado AS-10 não apresentou 100% de atividade nas primeiras 24h, sendo assim, não foi possível observar alterações nas fêmeas de *S.mansoni* no intervalo de duas horas (FIGURA 13A e 13B). No entanto, nos vermes machos já foi possível observar pequenas alterações induzidas pelo composto AS-10, como destruição parcial dos tubérculos e descamação do tegumento (FIGURA 13D), além de pequenas ulcerações (FIGURA 13C). No intervalo de tempo de 22h as alterações foram mais evidentes, as fêmeas se mostraram edemaciadas e com bolhas (FIGURA 13E), além disso, algumas bolhas se apresentavam rompidas causando uma lesão no tegumento das fêmeas (FIGURA 13F). Nos vermes machos as alterações foram similares as encontradas no tempo de duas horas, destruição parcial de tubérculos, presença de pequenas ulcerações e bolhas, também foi encontrada descamação no tegumento do parasito (FIGURA 13G e 13H).

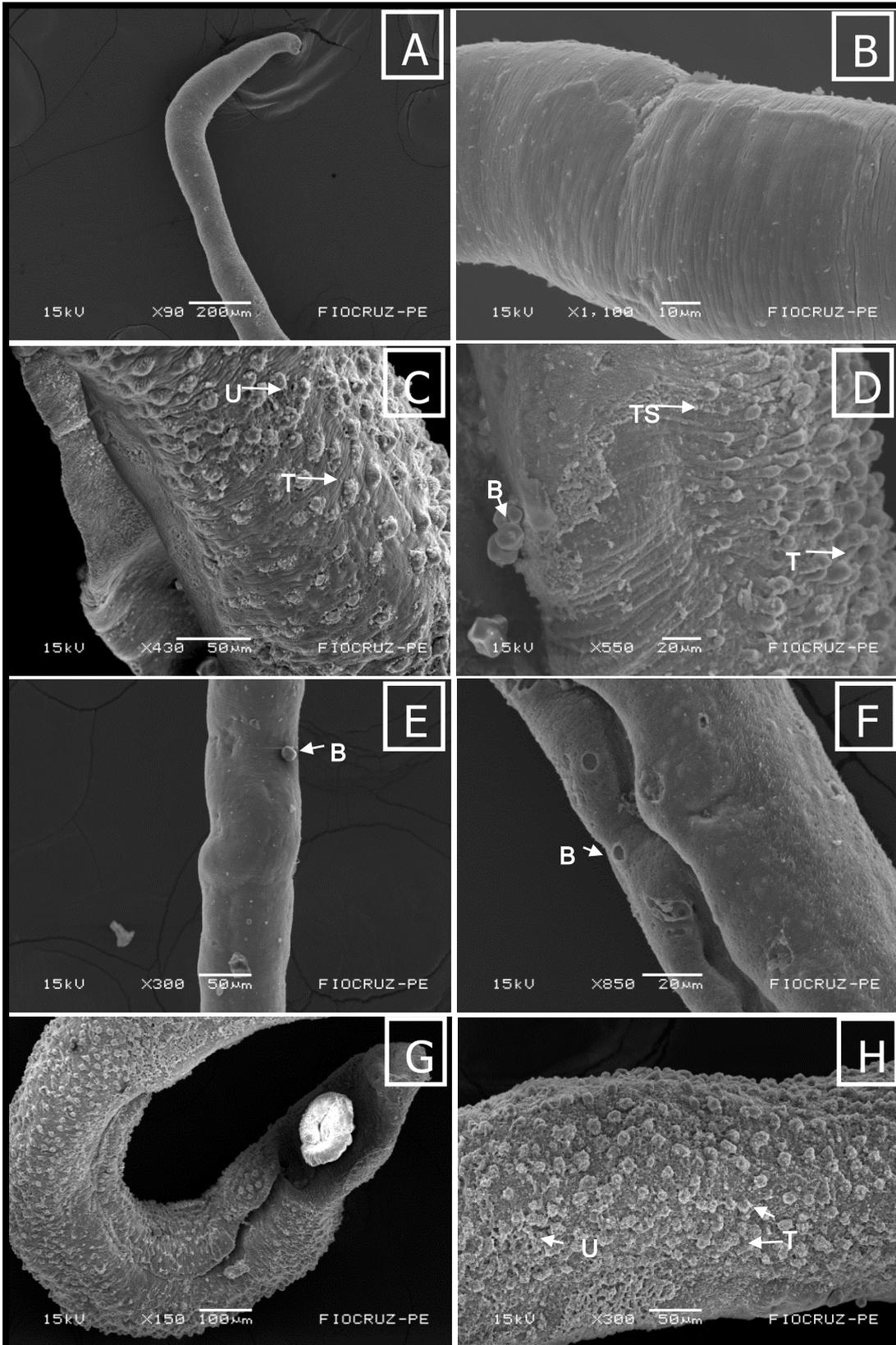


FIGURA 13: MEV de vermes adultos de *S. mansoni* após 2h (A-D) e 22h (E-H) de incubação com o composto AS-10. A e B: mostram fêmeas de *S.mansoni* com o tegumento sem nenhuma alteração. C e D: vermes machos com descamação do tegumento, destruição parcial dos tubérculos (T) e presença de bolhas (B). E e F: fêmeas edemaciadas com presença de bolhas (B) inteiras e estouradas. G e H: Machos com os tubérculos parcialmente destruídos (T) e ulcerações (U).

6.5 Tratamento na esquistossomose experimental do composto AS-09

6.5.1 Quantidade de ovos no fígado e no intestino

A FIGURA 13 demonstra a quantidade média de ovos de *S.mansoni* encontrados no fígado. Apesar do grupo tratado com o composto AS-09 ter uma média maior de ovos que os grupos controles a diferença entre os grupos não foi significativa.

Em relação a quantidade média de ovos encontrados no intestino, a FIGURA 14 mostra que houve uma redução significativa dos grupos tratados com o composto AS-09 em relação aos controles não tratados. Os dois grupos tratados com o derivado AS-09 demonstraram efeito sobre o número de ovos encontrados no intestino similar ao grupo tratado com o PZQ, não sendo encontrada diferença significativa.

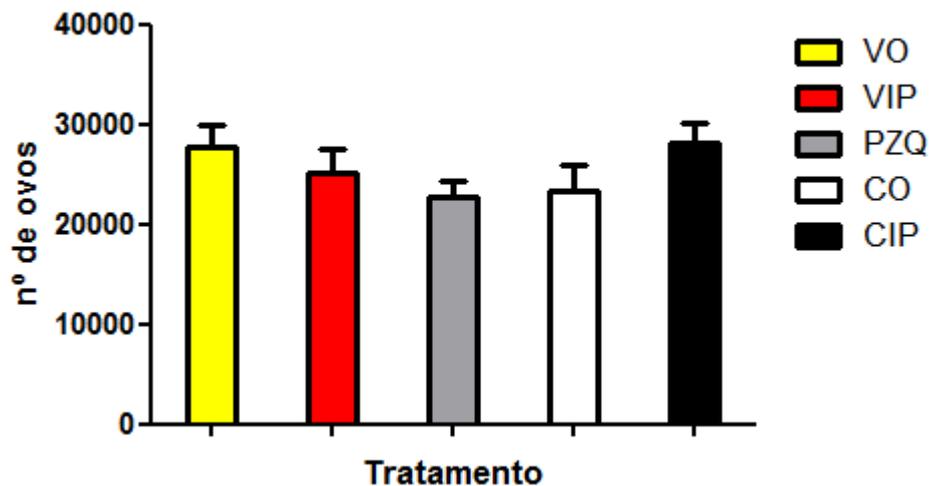


FIGURA 11: Quantidade de ovos de *S.mansoni* no fígado total de camundongos Swiss tratados com o composto AS-09 por via oral (VO) e intraperitoneal, controles tratados com o veículo por via oral (CO) e intraperitoneal (CIP), e controle positivo tratado com praziquantel (PZQ). Os resultados são demonstrados com média \pm desvio padrão. $p < 0.05$

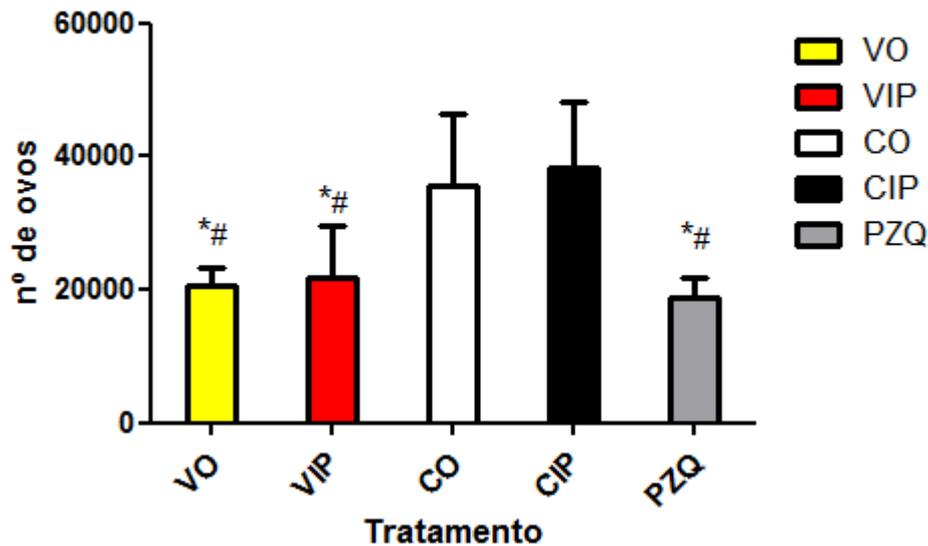


FIGURA 12: Quantidade de ovos de *S.mansoni* no intestino total de camundongos Swiss tratados com o composto AS-09 por via oral (VO) e intraperitoneal, controles tratados com o veículo por via oral (CO) e intraperitoneal (CIP), controles positivos tratados com praziquantel (PZQ). * e # indicam uma redução dos grupos VO, VIP e PZQ em relação aos grupos controles CO e CIP. $p < 0,05$.

6.5.2 Estádios dos ovos encontrados no Oograma.

O efeito do tratamento com o composto AS-09 sobre os estádios de desenvolvimentos dos ovos de *S.mansoni* está descrito na tabela 4. Os tratamentos com o composto foram capazes de reduzir o percentual de ovos imaturos, 7.46% (AS-09 IP) e 22.5% (AS-09 ORAL), em relação ao total de ovos encontrados comparando com os grupos que não foram tratados. Além disso, os compostos ainda foram capazes de aumentar o percentual de ovos inviáveis, 71,1% (AS-09 IP) e 53,85% (AS-09 ORAL) em relação aos grupos controles.

Na relação entre os grupos experimentais foi visto que o grupo tratado por via intraperitoneal se mostrou mais eficaz sobre o estadiamento dos ovos que o grupo tratado por via oral, obtendo uma eficácia semelhante ao praziquantel, não sendo evidenciada uma diferença estatística entre o grupo AS-09 IP e o grupo tratado com o PZQ.

TABELA 4: Diferença no estadiamento dos ovos encontrados no intestino de camundongos tratados com o composto AS-09 por via oral e intraperitoneal em relação aos grupos controles.

Grupos	Redução no número de ovos imaturos	Estádios dos ovos		
		Imaturos	Maduros	Inviáveis
CIP		73.56%	14.33%	12.11%
AS-09 IP	66,10% ^a	7.46%*	17.44%	75.10%
CO		72.54%	20.79%	6.66%
AS-09 Oral	50,08% ^b	22.5%*	23.69%	53.85%
PZQ		6.45%*	25.47%	68.08%

^a redução em comparação com o controle intraperitoneal

^b redução em comparação com o controle oral

Número de animais/grupo=10. 3 animais morreram no grupo tratado por via intraperitoneal

O asterisco indica que a diferença em relação ao controle foi estatisticamente significativa * p <0,001

6.5.3. Efeito do composto AS-09 na recuperação de vermes.

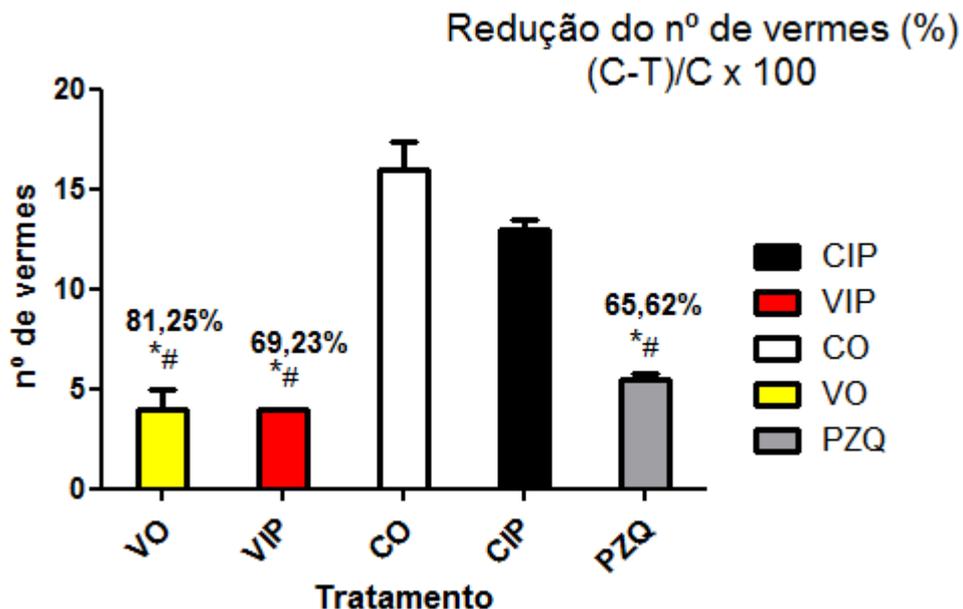


FIGURA 13 - Número de vermes adultos de *S.mansoni* recuperados de camundongos Swiss tratados com o composto AS-09 por via oral (VO) e intraperitoneal, e controles via oral (CO), intraperitoneal e praziquantel (PZQ). Houve redução no número de vermes de 81,25% (VO), 69,23% (VIP) e 65,62% (PZQ). * e # indicam que a redução do número de vermes dos grupos foi significativa em relação aos controles CO e CIP, com P<0.05.

A Figura 15 apresenta o número médio de vermes recolhidos do sistema porta-mesentérico de camundongos dos grupos tratados com o composto AS-09 por via intraperitoneal e oral, e dos controles tratados com o veículo por via oral e intraperitoneal, assim como do grupo tratado com o PZQ por via oral. Verificou-se que a carga parasitária dos camundongos tratados com o composto AS-09 e PZQ apresentou uma redução estatisticamente significativa em relação aos dois grupos não tratados. Utilizando a fórmula descrita no item 5.8.4 foi calculada uma redução de 69,23% no número de vermes do grupo AS-09 IP em relação ao controle tratado com o veículo por via intraperitoneal. Em relação aos tratamentos por via oral foi evidenciada uma redução de 85,21% do grupo tratado com o composto AS-09 e 65,62% do grupo tratado com o PZQ em relação ao grupo controle negativo.

7. DISCUSSÃO

A busca de novas terapias substitutivas do PZQ é objeto de estudo de alguns grupos de pesquisa que vêm buscando nos extratos de plantas (OLIVEIRA et al., 2014; GUIMARÃES et al., 2015) e nos compostos heterocíclicos sintéticos (ABDULLA et al., 2007; SAYED et al., 2008) alternativa ao tratamento convencional. A monoterapia utilizada ao longo dos anos pode selecionar cepas resistentes ao tratamento (FALLON et al., 1994). Em alguns trabalhos a diminuição da eficácia terapêutica do PZQ a I foi atribuída à resistência intrínseca de algumas cepas, e em outros casos, a uma resposta imune do hospedeiro infectado (ISMAIL et al., 1996). Outra limitação do PZQ refere-se a sua baixa atuação nas formas imaturas dos parasitos (CAFFREY, 2007).

Dessa forma o número de compostos orgânicos e sintéticos que vêm sendo utilizados como possíveis agentes esquistossomicidas vem aumentando ao longo dos anos, a exemplo de estudos utilizando extratos de plantas como *Baccharis trimera* (OLIVEIRA et al., 2014), epiisopiloturine (GUIMARÃES et al., 2015), curcumina (MORAIS et al., 2013) e dos compostos heterocíclicos sintéticos a exemplo do K1177 (ABDULLA et al., 2007), oxadiazóis (SAYED et al. 2008) e ftalil-tiazóis (SANTIAGO et al., 2014).

No presente trabalho foram realizados estudos com seis derivados ftalil-tiazóis os quais apresentaram expressivo potencial terapêutico contra os vermes de *S. mansoni*. A atividade esquistossomicida desta classe de compostos foi inicialmente descrita por Santiago et al., (2014). Os estudos in vitro com essa classe de moléculas, demonstraram um índice de mortalidade de 100% depois de 72h de incubação da droga aos parasitos (Santiago et al., 2014). Na tentativa de aperfeiçoar a atividade dos derivados ftalil-tiazóis quanto ao tempo de atuação da droga frente ao parasito, foram sintetizados novos ftalil-tiazóis, com substituições de radicais no carbono 4 da molécula de tiazol. Todos os derivados utilizados no estudo possuem a estrutura química semelhante, ftalimida condensada com o anel tiazólico, se diferenciando apenas no radical ligado ao carbono 4 do tiazol. Na avaliação da atividade esquistossomicida foi evidenciado que os compostos que contêm substituintes mais volumosos como bi-fenil (As-09) e 2-naftil (As-10) causaram 100% de mortalidade nos parasitos, sendo o composto AS-09 efetivo nas primeiras 24h.

Os grandes problemas apresentados por fármacos utilizados anteriormente no tratamento da esquistossomose foram os efeitos tóxicos e adversos. Devido a esse problema, os fármacos deixaram de ser utilizados (KATZ, 2008). O PZQ por sua vez, se mostrou ser menos tóxico que os primeiros fármacos esquistossomicidas utilizados na terapêutica. No entanto, o PZQ, ainda apresenta citotoxicidade elevada, sendo associado a efeitos colaterais (WOELFLE et al., 2011). Por esse motivo, a avaliação da citotoxicidade frente a modelos de células é de suma importância no desenvolvimento de novos fármacos para a introdução na terapêutica.

A avaliação da citotoxicidade dos derivados ftalil-tiazóis desse trabalho mostraram uma vantagem dos compostos AS-09 e AS-10 em relação ao PZQ, os compostos testados foram consideravelmente menos citotóxicos que o PZQ. Outros estudos envolvendo derivados com o núcleo da ftalimida também descrevem uma baixa citotoxicidade dos compostos (COSTA et al., 2015; NAGARAJAN et al., 2013).

Nos resultados da análise ultraestrutural foi observado que os compostos AS-09 e AS-10 conseguiram causar danos severos aos parasitos já nas duas primeiras horas. No entanto, o composto AS-10 não foi capaz de induzir lesão nas fêmeas de *S. mansoni* na avaliação de 2h, apenas após 22h de incubação. Em contrapartida, o composto AS-09 se mostrou severo para ambos os sexos nas primeiras duas horas e causou uma mortalidade de 100%, dos parasitos coletados no intervalo de tempo de 22h.

As características das lesões tegumentares causadas pelos compostos AS-09 e AS-10 se mostraram semelhantes, apresentando ulcerações, descamação e desintegração do tegumento com exposição do epitélio subtegumentar, destruição dos tubérculos e espículos, além de presença de diversas bolhas no tegumento. Essa similaridade nas lesões causadas pelos compostos sugere que as duas drogas podem atuar no mesmo alvo no tegumento. Em outros trabalhos foram observadas lesões no tegumento semelhantes as encontradas no tratamento com a mefloquina (MANNECK et al., 2011); a *Baccharis trimera* (OLIVEIRA et al., 2014) e aos ftalil-tiazóis estudados por Santiago et al (2014).

O tegumento cobre toda extensão do *S.mansoni* e tem um papel-chave para o sucesso da infecção, atuando na proteção contra a resposta imune do hospedeiro (SHAW et al., 1988) e na absorção de nutrientes e da síntese de proteínas (SHUHUA et al., 2000; BERTÃO et al., 2012). Portanto, fármacos que atuam sobre o

tegumento do *S.mansoni* se mostram promissores, pois o tegumento é de suma importância para a sobrevivência do parasito.

Baseando-se na efetividade demonstrada pelo composto AS-09, foi realizado um ensaio com camundongos na fase aguda da esquistossomose mansônica. Devido à baixa solubilidade em meio aquoso do derivado ftalil-tiazol, foi utilizado o cremophor EL a 15% a fim de melhorar a biodisponibilidade do composto. Foi observado que o composto AS-09 se mostrou ativo no tratamento da esquistossomose mansônica tanto por via intraperitoneal quanto por via oral, obtendo resultados próximos ao PZQ.

O primeiro parâmetro para avaliação da eficácia do tratamento com o composto AS-09 foi à quantificação dos ovos dos parasitos no fígado e no intestino dos camundongos infectados e tratados. Em relação à quantidade média de ovos encontrada no fígado, não se observou diferença significativa entre os grupos. No entanto, a quantidade média de ovos do intestino foi reduzida com o tratamento. Esse resultado corrobora com o resultado encontrado no teste in vitro, já que foi visto que o composto AS-09 mesmo em concentrações baixas foi capaz de inibir a oviposição.

Os camundongos infectados pelo *S. mansoni* e tratados com os compostos foram submetidos a eutanásia após 15 dias de administração das drogas. Os resultados obtidos com a contagem de ovos no fígado demonstraram que o intervalo de tempo de 15 dias não foi suficiente para eliminação desses ovos nesse tecido em nenhum dos compostos testados (AS-09 e PZQ). Tendo em vista que a infecção esquistossomótica resulta em uma reação inflamatória granulomatosa em resposta a antígenos dos ovos, verificamos a presença de granulomas mais exacerbados no tecido hepático, (CHEEVER et al., 2002; RASO et al., 1978) o que possivelmente, requer um intervalo maior ao observado para eliminação de ovos no tecido. No entanto a similaridade entre os grupos em relação a quantidade de ovos no fígado revela que a infecção foi semelhante para todos os grupos.

O segundo parâmetro para avaliação do tratamento foi o oograma. Nessa técnica os ovos encontrados no intestino são classificados quanto ao seu estágio de maturação: imaturos viáveis, maduros viáveis e inviáveis. No estudo de Pellegrino e Katz, 1968, foi realizado o oograma de duzentos camundongos infectados por *S.mansoni*, onde foi relatado que em torno de 75% dos ovos encontrados eram imaturos e em torno de 5% eram inviáveis. Os ovos de *S. mansoni* no intestino

levam de seis a sete dias para desenvolverem-se completamente, ou seja, passar do primeiro estágio para o quinto, quando há formação de um miracídio (ovo maduro). Os ovos maduros permanecem viáveis no intestino por cerca de doze dias (PRATA, 1957). Portanto, o tratamento é considerado eficaz quando a droga é capaz de reduzir significativamente o número de ovos imaturos e aumentar o número de ovos inviáveis.

Os tratamentos realizados como o composto AS-09 tanto por via intraperitoneal quanto por via oral, atenderam aos critérios de eficácia de tratamento descritos por Pelegrino e Katz (1968). No nosso estudo verificamos uma redução de 66,10% (via intraperitoneal) e 50,8% (via oral) de ovos imaturos no oograma e um aumento do número de ovos inviáveis. Essa eficácia foi semelhante à encontrada no tratamento com o PZQ. No entanto, três animais do grupo tratado por via intraperitoneal foram a óbito após o tratamento. Por esse motivo são necessários estudos para avaliar a toxicidade in vivo do composto AS-09.

O terceiro parâmetro utilizado para avaliar o tratamento foi à recuperação de vermes através da perfusão do sistema porta hepático. Nos experimentos realizados observamos uma diferença significativa entre os grupos tratados e não tratados. Houve uma redução de 69,23% no número de vermes do grupo AS-09 intraperitoneal em relação ao controle tratado com o veículo por via intraperitoneal. Em relação aos tratamentos por via oral foi evidenciada uma redução de 85,21% do grupo tratado com o composto AS-09 e 65,62% do grupo tratado com o PZQ em relação ao grupo controle negativo.

Os tratamentos realizados com o composto AS-09 tiveram eficácia semelhante ao PZQ, porém a taxa de redução demonstrada pelo PZQ em nosso trabalho (65,62%) foi abaixo do que é descrito na literatura, que é de 95% (XIAO et al., 1999). No entanto, essa redução da eficácia do PZQ já foi observada no estudo de Keiser et al., (2010), onde foi observada uma redução de apenas 17,8% do total de vermes, utilizando uma dose de 100mg/kg. Em um estudo clínico realizado no interior da Bahia também foi relatada uma baixa eficácia do tratamento com o PZQ (BLANTON et al, 2011). Vale ressaltar que o PZQ utilizado no estudo foi disponibilizado pelo Hospital das clínicas de Pernambuco (HC-PE).

No estudo foi visto que a classe de ftalil-tiazóis avaliada se mostrou ativa contra o verme adulto do *S.mansoni*. Os seis compostos foram capazes de causar alterações na motilidade e na oviposição dos vermes. No entanto foi evidenciado

que os radicais mais volumosos (bi-fenil, naftil) foram capazes de conferir aos ftaliltiazóis uma maior efetividade e ao mesmo tempo uma menor citotoxicidade em células de mamíferos.

8. CONCLUSÕES

As avaliações feitas até o momento por esse estudo revelaram que os derivados ftalil-tiazóis com substituintes mais volumosos conferiram uma baixa citotoxicidade para as moléculas e uma elevada eficácia no tratamento da esquistossomose.

Foi evidenciado também que os compostos AS-08, AS-09 e AS-10 foram mais efetivos que os outros derivados ftalil-tiazóis avaliados em estudos anteriores, causando 100% de mortalidade nos parasitos, além de reduzir a motilidade, causar lesões no tegumento e inibir completamente a oviposição.

Os compostos AS-09 e AS-10 foram capazes de induzir lesões similares no tegumento dos vermes, sugerindo que as drogas podem atuar no mesmo alvo.

O derivado AS-09 se mostrou eficaz no tratamento tanto por via intraperitoneal como por via oral, obtendo resultados semelhantes ao praziquantel. No entanto ainda são necessários estudos mais detalhados para avaliar a toxicidade *in vivo*.

Os resultados obtidos no presente estudo deram origem a um projeto de patente, encaminhado para o setor de notificação de patente do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ.

Esses resultados configuram o derivado AS-09 como um promissor candidato à fármaco esquistossomicida e, portanto, são necessários ensaios mais detalhados afim de encontrar a melhor dose efetiva do composto AS-09 além de sua toxicidade aguda, para que o qualifique para um posterior ensaio clínico.

REFERÊNCIAS

- ABDULLA, M. H. et al. Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. **PLoS Medicine**, São Francisco, v. 4, p. 20, 2007.
- ALBUQUERQUE, M. C. A. et al. Synthesis and schistosomicidal activity of new substituted thioximidazolidine compounds. **Pharmazie, Berlim**, v. 60, p. 13-17, 2005.
- ALMEIDA, M. M. **Efeito da quimioterapia com praziquantel no perfil de citocinas de indivíduos infectados pelo S. mansoni portadores de fibrose periportal**. 2009. 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Vale do Rio Doce, Governador Valadares, 2009.
- AL-TEL, T.H. AL-QAWASMEH, R. A.. Post Groebke–Blackburn multicomponent protocol: synthesis of new polyfunctional imidazo[1,2-a]pyridine and imidazo[1,2-a]pyrimidine derivatives as potential antimicrobial agents. **Eur J Med Chem**, Paris, v. 45, n.12, p. 5848–5855, 2010.
- BARBOSA, C. S. et al. Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na ilha de Itamaracá, Pernambuco. **Revista de Saúde Pública; Vitória**, v.34, p.337-341, 2000.
- BARBOSA, S. B.; GOMES, E. C. S. G. **Esquistossomose: Epidemiologia e histórico diagnóstico da esquistossomose**. Ed. Universitária da UFPE, Recife. 2008.
- BARDOC, A., et al. New Orally Active NonPeptide Fibrinogen Receptor (GpIIb-IIIa) Antagonists: Identification of Ethyl 3-[N-[4-[4-Amino[(ethoxycarbonyl)imino]methyl]phenyl]-1,3-thiazol-2-yl]-N-[1-(ethoxycarbonyl)methyl]piperid-4-yl]amino]propionate (SR 121787) as a Potent and Long-Acting Antithrombotic Agent. **J Med Chem**, Washington. v.40, p.3393-3401, 1997.
- BHARTI, S. K. et al. Synthesis, anti-bacterial and anti-fungal activities of some novel Schiff bases containing 2,4-disubstituted thiazole ring. **Eur J Med Chem**, Paris, v.45, n. 2, p.651-60. 2010.
- BECERRA, M. C. et al. In vitro activity of N-benzenesulfonylbenzotriazole on *Trypanosoma cruzi* epimastigote na trypomastigote forms. **Exp Parasitol**, Nova York. v. 131, p.57-62, 2012.
- BERTÃO, H. G. et al. Ultrastructural analysis of miltefosine-induced surface membrane damage in adult *Schistosoma mansoni* BH strain worms. **Parasitol Res**, Berlim v. 110, p. 2465-2473, 2012.
- BILHARTZ, T. “Further observations concerning distonum hematobium from a letter to C. T. von siebald” **Z. Wissensch Zool**, Leipzig, v. 4, p. 454-456, 1853.

BLANTON, R. E. et al. *Schistosoma mansoni* population structure and persistence after praziquantel treatment in two villages of Bahia, Brazil. **Int J Parasitol.** Nova York, v. 41, n.10, p. 1093–1099, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** 6. ed. Brasília, 2005.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica.** 7. ed. Brasília: Ed. do Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema de informação de agravos e notificação.** Esquistossomose. Brasília, 2009.

BOCHIS, R. J. et al. Isomeric phenylthioimidazo[1,2-a]pyridines as anthelmintics. **J Med Chem.** Washington. v. 24 p.1483–1487, 1981.

CAFREY R. C. Chemotherapy of Schistosomiasis: present and future. **Curr Op Chem Biol,** Londres, v. 11, p. 433-439, 2007.

CARVALHO, O.S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L.. **Schistosoma mansoni e esquistossomose:** uma visão multidisciplinar. Rio de Janeiro, FIOCRUZ, 2008.

CARVALHO, S. de et al. Neurotoxicidade do oxamniquine no tratamento da infecção humana pelo *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop,** São Paulo, v.27, n.3, p. 132-142, 1985.

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

CIOLI D; PICA-MATTOCCIA. L. Praziquantel. **Parasitol. Res,** Berlim , v. 90, Suppt. 1, p. 3-9, 2003.

CIOLI, D. et al. Will new antischistosomal drugs finally emerge? **Trends Parasitol,** Oxford, v. 24, p. 379–382. 2008.

CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Mol. Biochem. Parasitol.** Amsterdam, v. 21, p. 21–25, 2014.

CHEEVER, A. W, HOFFMAN, K. F, WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis mansoni in mice and men. **Immunol Today.** Cambridge v. 21, n. 9, p. 465-6, 2000.

CHEEVER, A. W. et al. Experimental Models of *Schistosoma mansoni* Infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** Rio de Janeiro, v.97, p. 7, 2002.

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

COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L.; organizadores. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose uma visão multidisciplinar**. 1 ed. Rio de Janeiro: editora FIOCRUZ; 2008a. p. 823- 847.

COELHO, L. C. D. **Síntese e Atividade Imunomoduladora de Ftalimidas N-Substituídos: obtenção de novas matrizes moleculares multi-alvos**. Dissertação (Mestrado em Inovações Terapêuticas), Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

COON, D. R. Schistosomiasis: Overview of the history, biology, clinicopathology, and laboratory diagnosis. **Clin. Microbiol. Newslette**, Nova York, v. 27, p.163-168, 2005.

COSTA, P. M. et al. Improvement of in vivo anticancer and antiangiogenic potential of thalidomide derivatives. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v.239, p. 174-183, 2015.

COURA, J. R., CONCEIÇÃO, M. J. Correlação entra carga parasitária do *S. Mansoni* e gravidade das formas clínicas em uma comunidade rural de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, Brasília, v. 14, p. 93-97, 1981.

COUTINHO, E. M. et al. Pathogenesis of schistosomal “pipestem” fibrosis: a low-protein diet inhibits the development of “pipestem” fibrosis in mice. **Int. J. Exp. Pathol**, Oxford, v. 78, p. 337-342, 1997.

CROMPTON, D. W. T.; PETERS, P.; SAVIOLI, L. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases first WHO report on neglected tropical diseases. **World Health Org**, 2010.

CHRISTOPHERSON JB. The successful use of antimiony in bilhaziasis. **Lancet**, Londres, v.2, p.325-327, 1918.

DEPOORTERE, H. et a. al. A novel nonbenzodiazepine hypnotic. I. Neuropharmacological and behavioral effects. **J Pharmacol Exp Ther**, Baltimorem v. 237, p. 649–658, 1986.

DOENHOFF, M. J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr Op Infect Dis**, Londres. v. 21, p.659–667, 2008.

DOENHOFF, M. J. et al. Praziquantel: its use in control of schistosomiasis in sub-Saharan Africa and current research needs. **Parasitology**, Londres v. 136, p. 1825–1835, 2009.

ELISSA M. M. et al. Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. **Int J Parasitol**. Nova York v. 41, n.2, p. 235-42, 2011.

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**, Baltimore, v. 51, p. 83–88, 1994.

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

FALLON P. G. Immunopathology of schistosomiasis: a cautionary tale of mice and men. **Immunol Today**, Cambridge. v. 21, p. 29-35, 2000.

FENWICK, A., WEBSTER J. P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment and drug resistance. **Curr Op Infect Dis**, Londres, v.19, p. 577-582, 2006.

FERRARI M.L. et al. Efficacy of oxamniquine and praziquantel in the treatment of *Schistosoma mansoni* infection: a controlled trial. **Bull World Health Organ, Genebra**, v. 81, p.190-196, 2003.

GIRI R. S. et al. Design, synthesis and characterization of novel 2-(2,4-disubstituted-thiazole-5-yl)-3-aryl-3*H*-quinazoline-4-one derivatives as inhibitors of NF- κ B and AP-1 mediated transcription activation and as potential anti-inflammatory agents. **Eur. J. Med. Chem**, Paris, v. 44, p. 2184–2189, 2009.

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

GRAY, D. J., et al. Schistosomiasis elimination: lessons from the past guide the future. **Lancet Infect Dis**, Nova York, v. 10, p. 733–736, 2010.

GREENBERG, R. M. Are Ca²⁺ channels targets of praziquantel action? **Int J Parasitol**, Nova York, v.35, p.1-9, 2005.

GUEDES, F. L.; DE OLIVEIRA, B. G.; HERNANDES, M. Z. , et al. Solid dispersions of imidazolidinedione by PEG and PVP polymers with potential antischistosomal activities. **AAPS Pharm SciTech**, Arlinghton, v.12, n. 1, p. 401-4010, 2011.

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

GUIMARÃES, M. A. et al. Anthelmintic activity in vivo of epiisopiloturine against juvenile and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **PLoS Negl Trop Dis**, São Francisco,;v. 9, n. 3. p.27, 2015.

GUITTI, J. C. S; GORDAN, L. N.; BALDY, J. L. S. Cardiac arrhythmia with oral oxamniquine in the treatment of *schistosomiasis mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop**, São Paulo, v. 35, n. 6, 1993.

HOFFMAN, W. A.; PONS, J. A., JANER, S. L. The sedimentation concentration method in *Schistosomiasis mansoni*. **P. R. J. Public Health**, Nova York, v. 9, p.283-291, 1934.

HASHIMOTO, Y. Structural Development of Biological Response Modifiers Based on Thalidomide. **Bioorg Med Chem**, Oxford. v.10, p. 461–479, 2002.

HOLTFRETER, M. C. et al. *Schistosoma mansoni*: Schistosomicidal effect of mefloquine and primaquine in vitro. **Exp Parasitol**, Nova York. v. 127, p. 270-276, 2011.

HATZ, C. F. *Schistosomiasis*: An underestimated problem in industrialized countries? **J Trav Med**, Hamilton, v. 382, p. 123-129, 2001.

HARGRAVE, K. D.; HESS, F. K.; OLIVER, J. T. N-(4-Substitutedthiazolyl)oxamic acid Derivatives, New Series of Potent, Orally Active Antiallergy Agents. **J Med Chem**, Washington, v. 26, p. 1158-1163, 1983.

ISMAIL, M. et al. Characterization of isolates of *S. mansoni* from Egyptian villagers that tolerate high doses of praziquantel. **Am J Trop Med Hyg**, Baltimore. v. 55, p. 214–218, 1996.

JEZIORSK, M. C., GREENBERG, R. M. Voltage-gated calcium channel subunits from platyhelminths: Potential role in praziquantel action. **Int. Journal for Parasitology**, Nova York, v.36, n.6, p.625-632, 2006.

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

KATSURDA, F. The etiology of a parasitic disease. **Iji Shimbun**, tokyo, v. 669 p. 1325–1332, 1904

KEISER, J. et al. Mefloquine – An Aminoalcohol with Promising Antischistosomal Properties in Mice. **Plos Negl Trop Dis**, São Francisco. v. 3, n. 1 p. 20, 2009.

KEISER, J.; VARGAS, M.; VENNERTROM, J. L. Activity of antiandrogens against juvenile and adult *Schistosoma mansoni* in mice. **J Ant Chem**, Londres, v. 65, p.1991-1995, 2010.

KEENAN, M *et al.*, Analogues of fenarimol are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* and are efficacious in a murine model of Chagas disease. **J Med Chem**, Washington, v. 55, p. 4189 - 4204, 2012.

KUNTZ, A. N. et al. Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansoni*: An essential parasite enzyme and a key drug target. **Plos Medicine**, São Francisco. v. 4, n. 6, p. 1071-1085, 2007.

KUSEL, J.; HANGAN, P. Praziquantel- its use, cost and possible development of resistance. **Parasitol Today**, Cambridge, v.15, p.352-354, 1999.

KAWAI, T. et al. Thalidomide attenuates excessive inflammation without interrupting lipopolysaccharide-driven inflammatory cytokine production in chronic granulomatous disease. **Clin Immunol**, Orlando, v.147, p. 122–128, 2013.

LAMBERTUCCI, J. R. et al. *Schistosoma mansoni*: assesment of morbidity before and after control. **Acta Tropica**, Basel, v.77, p 101-109, 2000.

LAMBERTUCCI, J. R. acute schistosomiasis: revisited and reconsidered. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 105, n. 4, p. 422-435, 2010.

LESCANO, S. Z. et al. Atividade antiparasitária do artemether na esquistossomose mansônica experimental. **Rev Saúde Pública**, Vitória, v. 38, n. 1, p. 71-75, 2004.

LIANG, Y. S. et al. Susceptibility to praziquantel of male and female cercariae of praziquantel-resistant and susceptible isolates of *Schistosoma mansoni*. **J Helminthol**, Londres, v. 84, p.202-207, 2010.

LIMA, P. C. et al. Synthesis and biological evaluation of new imidazo[1,2-a]pyridine derivatives designed as mefloquine analogues. **Farmaco**, Pavia, v.57, p.825–832, 2002.

LÓPEZ-MARTINEZ, M. et. al. Anti-anxiety and sedative profile evaluation of imidazo[1,2-a]pyridine derivatives. **Drug Dev Res**, Nova York, v.71, p.371–381, 2010

MANNECK, T.; HAGGENMÜLLER, Y.; KEISER, J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, London, v. 137, p. 85, 2010.

MELLIN, G. W.; KATZENSTEIN, M. Thalidomide neurotoxicity and rheumatoid arthritis. **N Engl J Med**, Boston, v.267, p.1184 – 1193, 1996.

MELO, J. O. F. et al. 1, 2, 3-triazolic heterocycles: history, preparations, applications and pharmacological activities. **Quim. Nova**, São Paulo. v. 29, n. 3, p.569-579, 2006.

MORAIS, E. R. et al. Efeitos da curcumina sobre o parasita *Schistosoma mansoni*: uma abordagem transcriptômica. **Mol Biochem Parasitol**, Amsterdam, v.187, n.2, p. 91-97, 2013.

MORASKI, G. C. et al. Isomeric phenylthioimidazol[1,2-a]pyridines as advent of imidazo[1,2-a]pyridine-3-carboxamides with potent multi-and extended drug resistant antituberculosis activity. **Acs Med Chem Lett**, Washington, v. 2, n 6, p. 466 – 470, 2011.

MOURÃO, S. C. **Preparação e caracterização de lipossomas contendo praziquantel**. 2001; 68p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2001.

MOURÃO, R. H. et al. Synthesis and Biological Activity of Novel Acridinylidene and Benzylidene thiazolidinediones. **Eur J Med Chem**, Paris, v.40, p.1129-1133, 2005

MULLER, G. W. et al. Amino-substituted thalidomide analogs: potent inhibitors of TNF- α production. **Bioorg. Med. Chem. Lett**, Oxford, v. 9, p. 1625–1630, 1999.

NAGARAJAN, S. et al. Synthesis and anti-angiogenic activity of benzothiazole, benzimidazole containing phthalimide derivatives. **Bioorg. Med. Chem Lett**, Oxford, v. 23, p. 287-290, 2013.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia Humana** 12. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

NEVES, J. K. A. L. et al. Biological and immunological activity of new imidazolidines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitol Res**, Berlim v. 107, p. 531-538, 2010.

NEVES, J. K. A. L. et al. Antichistosomal action action of thioxo-imidazolidine compounds: An ultrastructural and cytotoxicity study. **Exp Parasitol**, Nova York, v. 128, p. 82-90, 2011.

OLIVEIRA, R. N. et al. Anthelmintic activity in vitro and in vivo of Baccharis trimera (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Exp Parasitol**, Nova York, v.139, p.63-72, 2014.

PRATA, A. Tipos de ovos de *Schistosoma mansoni*. In:_____. Biópsia retal na esquistossomose mansoni: bases e aplicações no diagnóstico e tratamento. Rio de Janeiro: **Serviço Nacional de Educação Sanitária**. p.15-60, 1957.

PEREIRA, L. H. et al. Activityof 9-acridanone-hydrazone drugs detected at the pre-postural phase, in the experimental Schistosomiasis mansoni. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 90, n.3, p.425-428, 1995.

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

PELLEGRINO, J.; KATZ, N. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. **Adv Parasitol**, Londres, v.6, p.233-290, 1968.

PICCA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. **Int J f Parasitol**, Berlim, v.54, p. 527-533, 2004.

PICA-MATTOCCIA, L. et al. Genetic analysis of decreased praziquantel sensitivity in a laboratory strain of *Schistosoma mansoni*. **Acta Tropica**, Basel. v. 111, p. 82-85, 2009.

PATT, W. C. et al. Structure-activity relationships of a Series of 2-Amino- 4-thiazole Containing Renin Inhibitors. **J Med Chem**, Washington, v.35, p.2562-2572, 1993.

PITTA, M. G. R. et al. New imidazolidinic bioisosters: potential candidates for antischistosomal drugs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 101, Suppt. 1, p. 313-316, 2006.

PORDEUS, L. C. et al. ocorrência das formas aguda e crônica da esquistossomose mansônica no Brasil no período de 1997-2006: Uma revisão de literatura. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v. 17, n. 3, 163-175, 2008.

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

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

RASO, P. et al. As dimensões do granuloma causado pelos ovos do schistosoma mansoni no fígado humano. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, Brasília, v. 7, p. 45-47, 1978.

RICHARDS, H. C.; FOSTER, R. A. new series of 2-aminomethyltetrahydroquinoline derivatives displaying schistosomicidal activity in rodents and primates. **Nature**, Londres, v.22, p.581-582,1969.

VARGESSION, N. Thalidomide Embryopathy: An Enigmatic Challenge. **ISRN Develop. Biology**, Orlando. 2013.

RABELLO, A. L. et al. Humoral immune reponses in patients with acute *Schistosoma mansoni* infection who were followed up for two years after treatment. **Clin. Infect. Dis**, Chicago, v. 24, p. 304-308, 1997.

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

REY, L. **Parasitologia**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ROMANHA, A. J. et al. In vitro and in vivo experimental models for drug screening and development for Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.105, n.2, p. 233-238, 2010.

SAMBON, L. W. New or little known African entozoa. **J Trop Med Hyg**, Baltimore, v. 10, p.117, 1907.

SANTIAGO, E. F. et al. Evaluation of the anti-*Schistosoma mansoni* activity of thiosemicarbazones and thiazoles. **Antimicrob Agents Chemother**, Washington, v. 58, n. 1, p.352-63, 2014.

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

SHARMA, R. N. et al. Synthesis of 4-Benzyl-1,3-thiazole derivatives as potential antiinflammatory agents: An Analogue-based Drug Design Approach. **J Enzyme Inhib Med Chem**,. Londres, v. 24, p. 890 – 897, 2009.

SHAW, M. K.; ERASMUS, D. A. *Schistosoma mansoni*: praziquantel-induced changes to the fe- male reproductive system. **Exp. Parasitol**, Nova York, v.65, p. 31-42, 1988.

SHIRADKAR, M. et al. Clubbed triazoles: A novel approach to antitubercular drugs. **Eur. J. Med. Chem**, Paris, v. 42, p. 807–816, 2007.

SHUHUA, X.; HOTEZ, P. J.; TANNER, M. Artemether, an effective new agent for chemoprophylaxis against schistosomiasis in China: its in vivo effect on the biochemical metabolism of the Asian schistosome. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, Bangkok, v. 31, n.4, p. 724-32, 2000.

SIDDIQUI N. et al. Thiazoles: A Valuable Insight into the Recent Advances and Biological Activities. **Int. J. Pharm. Sci. Drug. Res**, Mathura, v.1, n. 3, p. 136-143, 2009.

SILVA, A. C. A. Study of the Activity of 3-benzyl-5-(4-chloro-arylazo)-4-thioxoimidazolidin-2-one against Schistosomiasis Mansoni in Mice. **The Sci. W. J.**, Nasr City, v.1, p. 1-8, 2012.

SILVA, K. E. R. et al. Alternativas terapêuticas no combate à Esquistossomose Mansônica. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, Araraquara, v.33, n.1, p.9-16, 2012.

SILVA, P. C. V.; DOMINGUES, A. L. C. Aspectos epidemiológicos da esquistossomose hepatoesplênica no Estado de Pernambuco, Brasil. **Epidemiol. Serv. Saúde**, Brasília, v. 20, n. 3, 2011.

SHAOHONG, L. et al. Evaluation of the anthelmintic effects of artesunate against experimental *Schistosoma mansoni* infection in mice using different treatment protocols. **Parasitol Int**, Amsterdam, v. 55, n.1, p.63-68, 2006.

STARRET, J. E., MONTZKA, T. A., CROSSWELL, A. R. Synthesis and biological activity of 3-substituted imidazo[1,2-a]pyridines as antiulcer agents. **J Med Chem**, Washington, v. 32, p. 2204–2210, 1989.

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

TEO, S. K. Properties of Thalidomide and its Analogues: Implications for Anticancer Therapy. **The AAPS Journal**, Arlington, v. 7, p. 14-19, 2005.

TALLIMA, H.; RIDI, R. Praziquantel binds *Schistosoma mansoni* adult worm actin, **Int. J. Ant. Ag.**, Amsterdam, v.29, p.570–575, 2007.

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

WERMUTH, C. G. **The practice of medicinal chemistry**. 3. ed. Academic Press, Philadelphia, 2008.

WILSON, M. S, et al. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol Cell Biol**, Adelaide, v.85, n.2, p.148-154, 2007.

WOELFLE, M. et al. Resolution of praziquantel. **PLoS Negl Trop Dis**. São Francisco, v.5, n.9, p.1260, 2011.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Media centre: Schistosomiasis. Geneve, 2013 (Facts sheets. n.115).

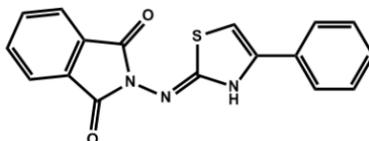
Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>> Acessado em: 15 mar. 2013.

XIAO, S. et al. Therapeutic effect of praziquantel enantiomers in mice infected with *Schistosoma mansoni*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, Baltimore, v.93, p.324-325, 1999.

ZHANG, S. M.; COULTAS, K. A. Identification of plumbagin and sanguinarine as effective chemotherapeutic agents for treatment of schistosomiasis. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, Amsterdam, v. 3 p. 28-34, 2013

APÊNDICE A - Dados Espectroscópicos

2-(4-feniltiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-02)



Características Físico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 194-196°C; Rend.: 0.62 g (65%); Rf: 0.60 (Hexano / Acetato de etila 1:1).

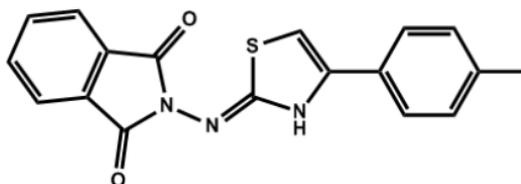
PM (C₁₇H₁₁N₃O₂S): 321,35 g/mol.

Análise Elementar para C₁₇H₁₁N₃O₂S: Teórico: C, 63.54; H, 3.45; N, 13.08; S, 9.98. Calculado: C, 62.08; H, 3.41; N, 12.98; S, 9.71.

IV (KBr), principais sinais: 3123.66 (NH), 1742.23 (C=O) cm⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.231-7.268 (t, 1H, Ar), 7.313-7.331 (t, 2H, Ar), 7.376 (s, 1H, tiazol), 7.689 e 7.708 (d, 2H, Ar), 7.949-8.023 (m, 4H, Ar), 10.652 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 104.769 (C-H, tiazol), 123.814 (C-H, Ar), 125.541 (C-H, Ar), 127.710 (C-H, Ar), 128.570 (C-H, Ar), 129.321 (C, Ar), 133.983 (C, Ar), 135.370 (C-H, Ar), 149.915 (C, tiazol), 165.498 (C=O), 167.582 (S-C=N, tiazol).

2-(4-p-toluiltiazol-2-ilamino)isoindolono-1,3-diona (As-03)

Características Físico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 214-216oC; Rend.: 0.36 g (37%); Rf: 0.65 (Hexano / Acetato de etila 1:1).

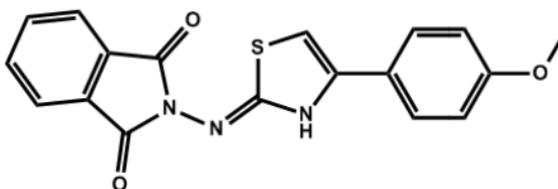
PM (C₁₈H₁₃N₃O₂S): 335,38 g/mol.

Análise Elementar para C₁₈H₁₃N₃O₂S: Teórico: C, 64.46; H, 3.91; N, 12.53; S, 9.56. Calculado: C, 63.17; H, 3.81; N, 12.18; S, 9.17.

IV (KBr), principais sinais: 3117.64 (NH), 1738.51 (C=O) cm⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2.263 (s, 3H, CH₃), 7.128 e 7.145 (d, 2H, Ar), 7.297 (s, 1H, tiazol), 7.580 e 7.597 (d, 2H, Ar), 7.970-8.003 (m, 4H, Ar), 10.405 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 20.803 (CH₃), 103.862 (C-H, tiazol), 123.86 (C-H, Ar), 125.518 (CH, Ar), 129.166 (C-H, Ar), 129.336 (C, Ar), 131.389 (C, Ar), 135.416 (C, Ar), 137.050 (C, Ar), 150.171 (C, tiazol), 165.560 (C=O), 167.543 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(4-metoxifenil)thiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-04)

Características Físico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 215-218oC; Rend.: 0.72g (72%); Rf: 0.53 (Hexano / Acetato de etila 6:4).

PM (C₁₈H₁₃N₃O₃S): 351,38 g/mol.

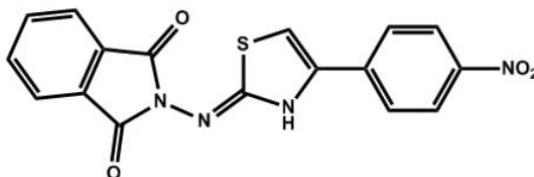
Análise Elementar para C₁₈H₁₃N₃O₃S: Teórico: C, 61.53; H, 3.73; N, 11.96; S, 9.13.

Calculado: C, 58.88; H, 3.87; N, 11.38; S, 8.77.

IV (KBr), principais sinais: 3232.68 (NH), 1748.64 (C=O) cm⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1.025 (s, 3H, CH₃), 6.876 e 6.905 (d, 2H, Ar), 7.203 (s, 1H, tiazol), 7.601 e 7.630 (d, 2H, Ar), 7.942 – 8.022 (m, 4H, Ar), 10.723 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 25.528 (CH₃), 102.721 (C-H, tiazol), 114.007 (C-H, Ar), 123.897 (CH, Ar), 126.705 (C, Ar), 127.010 (C-H, Ar), 129.383 (C, Ar), 135.416 (C-H, Ar), 149.490 (C, tiazol), 158.576 (C-O, Ar), 165.576 (C=O), 167.621 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(4-nitrofenil)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-08)

Características Físico-Químicas: Cristais amarelos; PF: 239-240 oC; Rend.: 0.43 g (41%); Rf: 0.45 (Hexano / Acetato de etila 6:4).

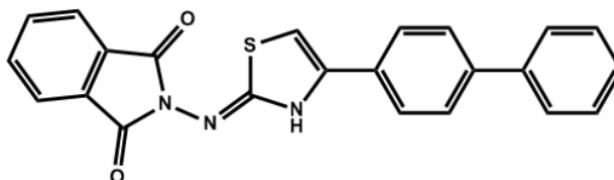
PM (C₁₇H₁₀N₄O₄S): 366,35 g/mol.

Análise Elementar para C₁₇H₁₀N₄O₄S: Teórico: C, 55.73; H, 2.75; N, 15.29; S, 8,75. Calculado: C, 54.40; H, 2.87; N, 15.23; S, 9.11.

IV (KBr), principais sinais: 3309.85 (NH), 1724.82 (C=O) cm⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.773 (s, 1H, tiazol), 7.950-7.98 (m, 4H, Ar), 8.010 e 8.032 (d, 2H, Ar), 8.196 e 8.218 (d, 2H, Ar), 10.543 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 109.625 (C-H, tiazol), 123.899 (C-H, Ar), 124.116 (C-H, Ar), 126.416 (C-H, Ar), 129.305 (C-N, Ar), 135.416 (C-H, Ar), 139.955 (C, Ar), 146.329 (C, Ar), 147.948 (C, tiazol), 165.382 (C=O), 168.047 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(bifenil-4-il)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-09)

Características Físico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 240-241°C; Rend.: 0.52g (46%); Rf: 0.65 (Hexano / Acetato de etila 6:4).

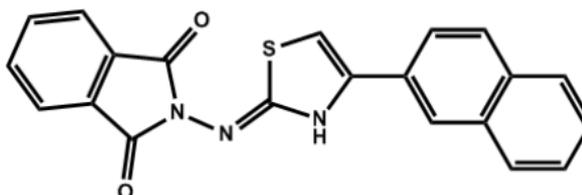
PM (C₂₃H₁₅N₃O₂S): 397,45 g/mol.

Análise Elementar para C₂₃H₁₅N₃O₂S: Teórico: C, 69.50; H, 3.80; N, 10.57; S, 8.07. Calculado: C, 66.81; H, 3.98; N, 10.48; S, 7.95.

IV (KBr), principais sinais: 3324.67 (NH), 1660.10 (C=O) cm⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.354 (s, 1H, tiazol), 7.450 – 7.500 (t, 1H, Ar), 7.579 – 7.679 (m, 4H, Ar), 7.705 – 7.734 (d, 2H, Ar), 7.765 – 7.871 (m, 4H, Ar), 7.941 – 7.970 (d, 2H, Ar), 10.648 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 103.408 (C-H, tiazol), 126.514 (C-H, Ar), 126.850 (C-H, Ar), 127.483 (C-H, Ar), 127.987 (C-H, Ar), 128.986 (C-H, Ar), 130.078 (C-H, Ar), 131.535 (C-H, Ar), 133.878 (C, Ar), 136.137 (C-H, Ar), 138.998 (C, Ar), 139.693 (C, Ar), 150.208 (C, tiazol), 167.591 (C=O), 168.285 (S-C=N, tiazol).

2-(4-(naftalen-2-il)tiazol-2-ilamino)isoindolino-1,3-diona (As-10)

Características Físico-Químicas: Cristais amarelo-claros; PF: 225-227 °C; Rend.: 0.50 g (47%); Rf: 0.50 (Hexano / Acetato de etila 6:4).

PM (C₂₁H₁₃N₃O₂S): 371,41 g/mol.

Análise Elementar para C₂₁H₁₃N₃O₂S: Teórico: C, 67.91; H, 3.53; N, 11.31; S, 8.63. Calculado: C, 64.89; H, 3.48; N, 11.45; S, 8.26.

IV (KBr), principais sinais: 3169.87 (NH), 1743.89 (C=O) cm⁻¹

RMN de ¹H (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.474 (t, 2H, Ar), 7.533 (s, 1H, tiazol), 7.854 e 7.883 (d, 4H, Ar), 7.990-8.077 (m, 4H, Ar), 8.226 (s, 1H, Ar), 10.479 (s, 1H, NH).

RMN de ¹³C e DEPT (75.5 MHz, DMSO-d₆): δ 105.504 (C-H, tiazol), 123.891 (C-H, Ar), 124.178 (C-H, Ar), 126.091 (C-H, Ar), 126.447 (C-H, Ar), 127.144 (C-H, Ar), 127.555 (C-H, Ar), 128.074 (C-H, Ar), 128.151 (C-H, Ar), 129.344 (C, Ar), 131.513 (C, Ar), 132.458 (C, Ar), 132.969 (C, Ar), 135.432 (CH, Ar), 150.062 (C, tiazol), 165.576 (C=O), 167.961 (S-C=N, tiazol).

ANEXO A – Parecer da CEUA



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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

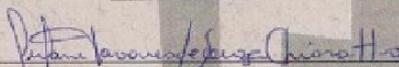
Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado: **Potencial terapêutico de novos fármacos com atividade esquistossomícida**, protocolado sob nº 67/2014 pelo (a) pesquisador (a) Sheilla Andrade de Oliveira, está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 19/01/2015. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 29 de janeiro de 2018.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongo <i>Mus musculus Swiss</i>	296

We certify that project entitled **Potencial terapêutico de novos fármacos com atividade esquistossomícida**. Protocol nº 67/2014, coordinated by Sheilla Andrade de Oliveira, is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on January, 19, 2015. In present version this project is licensed and valid until January, 29, 2018.

Recife (PE, Brazil) January, 29, 2015.


 Dr^a Gerlane Tavares de Souza Chioratto
 Vice-Coordenadora CEUA/CPqAM