

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Novas imidazolidinas potencialmente ativas no combate à  
esquistossomose: síntese e avaliação da atividade no *Schistosoma mansoni***

MÔNICA CAMELO PESSÔA DE AZEVEDO ALBUQUERQUE

RECIFE - BRASIL  
2002

# **MÔNICA CAMELO PESSÔA DE AZEVEDO ALBUQUERQUE**

**Novas imidazolidinas potencialmente ativas no combate à esquistossomose: síntese e avaliação da atividade no *Schistosoma mansoni***

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

## **Orientadores**

Prof. Dr. Ivan da Rocha Pitta  
Prof. Dr. José Valfrido de Santana

**DEDICO ESTE TRABALHO**

*Aos meus pais*

*Sebastião Pessoa de Azevedo (in memoriam)*

*e Aurora Camelo Pessoa de Azevedo*

*Ao meu esposo João Carlos de Albuquerque*

*e meus filhos Túlio, Ítalo e Natália*

*À minha irmã Eulália C. P. A. Ximenes*

## AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Ivan da Rocha Pitta, do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE, e ao Professor Doutor José Valfrido de Santana, do Laboratório de Esquistossomose experimental do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), meus orientadores, pela confiança que me foi dada para desenvolver essa nova linha de pesquisa, pela forma com que me acolheram e pela amizade.

À Professora Doutora Suely Lins Galdino, do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE, pelo seu envolvimento neste trabalho, compartilhando as descobertas e fracassos, pelos ensinamentos, incentivos e pela amizade mais fortalecida.

À Professora Doutora Elizabeth Malagueño, do Laboratório de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) pela amizade, incentivos, e sobretudo confiança e valorização a minha pessoa.

À Professora Doutora Maria do Carmo Alves de Lima, do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Departamento de Antibióticos da UFPE, pela sua acolhida, companheirismo, amizade, incentivos.

À Professora Doutora Vera Magalhães do Departamento de Medicina Tropical, por sua valiosa sugestão em trabalhar com *Schistosoma mansoni*.

Ao Professor José Maurício Alves Camello, minha gratidão pelo incentivo e acolhida na disciplina de Parasitologia.

Aos professores Doutores Mohamed Saad Lahlou e Glória Isolina Pinto Duarte, do Departamento de Fisiologia e Farmacologia pelas sugestões, doações de algumas drogas e pela amizade.



Ao professor João Inácio Irmão da disciplina de Parasitologia do Departamento de Medicina Tropical, pela parceria mantida através do fornecimento dos moluscos.

À Doutora Christina Peixoto do Departamento de Patologia e Biologia Celular do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ) e toda sua equipe pela colaboração na realização da microscopia eletrônica de varredura.

À Professora Doutora Rosângela Coelho do Laboratório de Virologia do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA) pela confiança com que me cedeu seu laboratório para realização de parte dos experimentos biológicos.

Aos colegas da disciplina de Parasitologia do departamento de Medicina Tropical em especial a Sandra Botelho, João Irmão e Márcia Pascoal pelo convívio saudável e amizade.

Aos alunos de iniciação científica Ildernando José de Oliveira, Amanda Barbosa, Maíra Pitta, Poliana Guabiraba e Flaviana de Carvalho pela convivência saudável e aprendizagens mútuas.

Aos amigos do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, em especial a Angela Andrade, Ana Maria Alves, Leila Cabral, Teresinha Gonçalves, Silvânia Maria e Rosa Mourão por toda colaboração e agradável convívio.

Aos amigos do Laboratório de Esquistossomose experimental e de Imunologia do Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), Vladia, Silvana, Sandriana, Carol, Renata, Luís Felipe, pela amizade e cooperação.

Às funcionárias do Curso de Doutorado em Ciências Biológicas, Adenilda, Jaciene e Liane pelo bom atendimento e carinho.

A todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram com a realização desse trabalho, os meus sinceros agradecimentos.

## RESUMO

A esquistossomose, doença causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, parasitas responsáveis por quadros patológicos debilitantes, atinge 200 milhões de pessoas e expõe outras 600 milhões em situação de risco. A quimioterapia representa a única ferramenta para os indivíduos acometidos por esses parasitas, restringindo-se atualmente ao praziquantel e ao oxaminiquine. Apesar da eficácia dessas drogas, os índices de prevalência da doença vêm sendo mantidos há décadas devido a fatores sócio-econômicos e a ocorrência de resistência dos schistosomas às drogas. Faz-se necessário, portanto, medidas urgentes e efetivas que conduzam energicamente à pesquisa de novas drogas. Utilizando conceitos fundamentais da Química Medicinal, propomos neste trabalho a executar um programa estratégico de ações científicas e tecnológicas para contribuirmos, na introdução de novos agentes esquistossomicidas imidazolidínicos, mediante a síntese e avaliação da susceptibilidade de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* mantidos *in vitro*. Os resultados obtidos demonstraram que os compostos estudados causaram efeitos nos vermes, alterando sobretudo a viabilidade, motilidade, pareamento e integridade do tegumento. Os compostos FZ-4, JT-59 e JT-62 foram os mais ativos, causando 100% de mortalidade dos vermes ao final do período de tratamento. Em geral, os vermes fêmeas mostraram-se mais sensíveis que os machos frente a todos compostos ensaiados. Vesículas, colapso de tubérculos e descamações constituíram as alterações mais frequentes observadas no tegumento dos schistosomas tratados. O efeito do carbacol, abolindo a motilidade dos vermes provocada por FZ-4, sugere uma ação em receptores colinérgicos. O sistema neuromuscular do *Schistosoma*, pelas características farmacológicas únicas apresentadas, pode ser usado como alvo para ataque de agentes esquistossomicidas.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a disease caused by flatworms belonging to the genus *Schistosoma*, responsible for debilitating pathological pictures. It is estimated that about 200 million people in the world are currently affected and displays others 600 million at risk situation. The chemotherapy is the major tool for the control of schistosomiasis, restrict to praziquantel and oxaminiquine. Despite the effectiveness of these drugs, the prevalence indices of the illness have being kept during decades, due to economic factors and the occurrence of drug resistant schistosomes. It becomes necessary, therefore, urgent and effective measured towards the research of new drugs. Using basic concepts of Medicinal Chemistry, we intend in this work to execute strategical program of scientific and technological actions in order to contribute, through the synthesis and evaluation of the susceptibility of *Schistosoma mansoni* adult worms *in vitro*, to new imidazolidinic antischistosomal agents. Results had demonstrated that these compounds had effect in the worms, modifying the viability, motility, pairing and also integrity of the tegument. The compounds FZ-4, JT-59 and JT-62 had been most active, causing 100% of mortality of the worm at the end of the treatment period. In general, the female worms are more sensible than the males to all assayed compounds. Vesicles, collapse of tubercles and peeling are the most frequent observed alterations in the tegument of schistosome. The effect of carbacol, abolishing the motility of the worms caused by FZ-4, suggests action in cholinergic receptors. The neuromuscular system of the schistosome, due to its pharmacological characteristics, can be used as attack target of antischistosomal agents.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Distribuição geográfica da esquistossomose mansoni no Brasil	7
Figura 02: Casal de <i>Schistosoma mansoni</i> em cópula	9
Figura 03: Estruturas químicas de esquistossomicidas	26
Figura 04: Diagrama de Síntese dos derivados JT-57, JT-62 e JT-67	38
Figura 05: Espectro de massa da 5-(3-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>HT-12</b>	136
Figura 06: Espectro de massa da 5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>HT-13</b>	136
Figura 07: Espectro de massa da 5-(3-Cloro-benzilideno)-3-(4-fenil-benzil)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-17</b>	137
Figura 08: Espectro de massa da 3-(4-fenil-benzil)-5-(3-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-57</b>	137
Figura 09: Espectro de massa da 3-benzil-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-58</b>	138
Figura 10: Espectro de massa da 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-59</b>	138
Figura 11: Espectro de massa da 3-(4-bromo-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-60</b>	139
Figura 12: Espectro de massa da 3-(4-flúor-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-61</b>	139
Figura 13: Espectro de massa da 3-(4-fenil-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-62</b>	140
Figura 14: Espectro de massa da 3-(4-fenil-benzil)-5-(4-metil-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-67</b>	140
Figura 15: Espectro de infravermelho da 5-(3-cloro-benzilideno)-3-(4-fenil-benzil)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-17</b>	141
Figura 16: Espectro de infravermelho da 3-(4-fenil-benzil)-5-(3-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-57</b>	142
Figura 17: Espectro infravermelho da 3-benzil-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-58</b>	143
Figura 18: Espectro de infravermelho da 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-59</b>	144

Figura 19: Espectro de infravermelho da 3-(4-bromo-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT60</b>	145
Figura 20: Espectro de infravermelho da 3-(4-flúor-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-61</b>	146
Figura 21: Espectro de infravermelho da 3-(4-fenil-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-62</b>	147
Figura 22: Espectro de infravermelho da 3-(4-fenil-benzil)-5-(4-metil-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-67</b>	148
Figura 23: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 5-(3-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>HT-12</b>	149
Figura 24: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>HT-13</b>	150
Figura 25: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 5-(4-metil-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>HT-14</b> .	151
Figura 26: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 5-(3-cloro-benzilideno)-3-(4-fenil-benzil)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-17</b> .	152
Figura 27: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-(4-fenil-benzil)-5-(3-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-57</b>	153
Figura 28: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-benzil-5-(4-flúorbenzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-58</b>	154
Figura 29: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-59</b>	155
Figura 30: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-(4-bromo-benzil)5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-60</b>	156
Figura 31: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-(4-flúor-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-61</b>	157
Figura 32: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-(4-fenil-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-62</b>	158
Figura 33: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-(4-fenil-benzil)-5-(4-metil-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona <b>JT-67</b>	159

## SUMÁRIO

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
Lista de Figuras	viii
1- INTRODUÇÃO	001
2- ESQUISTOSSOMOSE MANSONI	005
2.1- Distribuição Geográfica e Dados Epidemiológicos	006
2.2- Características Biológicas dos Vermes Adultos	008
2.2.1- Morfologia	008
2.2.2- Ciclo Biológico	010
2.2.3- Neurotransmissores	012
2.3- Patogenia	014
2.4- Diagnóstico	016
2.5- Controle	018
3- DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS	020
4- RESISTÊNCIA AOS ESQUISTOSSOMICIDAS	027
5- PERSPECTIVAS DE NOVAS DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS	031
6- CAPÍTULO 1	039
Synthesis and schistosomicidal activity of benzylidene imidazolidine compounds	
7- CAPÍTULO 2	050
Susceptibility <i>in vitro</i> of <i>Schistosoma mansoni</i> to imidazolidinone derivatives	
8- CAPÍTULO 3	054
A resposta do <i>Schistosoma mansoni</i> mantido <i>in vitro</i> a derivados imidazolidinônicos	
9- CAPÍTULO 4	064
Effects of imidazolidinedione derivatives on the adult worms of <i>Schistosoma mansoni</i> maintained <i>in vitro</i>	
10- CAPÍTULO 5	079
Tegumental alterations in adult <i>Schistosoma mansoni</i> treated with imidazolidine derivatives	

11- CAPÍTULO 6	104
<i>Schistosoma mansoni</i> : efeito de uma imidazolidina-2,4-diona em receptores colinérgicos	
12- CONCLUSÕES	113
13- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
14- ANEXOS	131
Anexo 1: Síntese dos derivados 2-tioxo-imidazolidin-4-onas	132
Anexo 2: Espectros de identificação dos derivados 2-tioxo-imidazolidin-4-onas	136
Anexo 3: Avaliação da suscetibilidade <i>in vivo</i> do <i>Schistosoma mansoni</i> frente a derivados imidazolidínicos	160
Anexo 4: Avaliação da suscetibilidade <i>in vitro</i> do <i>Schistosoma mansoni</i> frente a derivados imidazolidínicos	162



# INTRODUÇÃO

## 1- INTRODUÇÃO

Nos países menos desenvolvidos, as faltas de saneamento básico e de educação sanitária inserem os indivíduos de baixa renda no ciclo Pobreza-Doença, condenando esta parcela da população a uma vida sem perspectivas pois, aquela que deveria ser a sua maior riqueza, a saúde, encontra-se fragilizada e, na maioria das vezes, vencida por seres parasitas que lhes espoliam silenciosamente.

Como solução imediata para aqueles que padecem com as doenças parasitárias, tem-se o tratamento com agentes quimioterápicos, cujo progresso atingiu elevados patamares de eficácia, tolerabilidade e destaque como a principal ferramenta de controle.

Nesse contexto, encontra-se a esquistossomose, doença causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, parasitas responsáveis por quadros patológicos debilitantes, e que utilizam o meio aquático como ambiente para evolução das formas intermediárias infectantes.

A intervenção quimioterápica recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para a esquistossomose está representada pelo praziquantel, droga de primeira escolha no tratamento da doença, quando provocada por todas as espécies de *Schistosoma*, e pelo oxamniquine, fármaco de segunda escolha, mas indicado apenas nas infecções provocadas pelo *S. mansoni*. Portanto, o praziquantel apresenta-se hoje como a principal ferramenta para controle da doença. Apesar de sua eficácia, os índices de prevalência da esquistossomose vêm sendo mantidos há décadas, atingindo 200 milhões de pessoas e expondo outras 600 milhões em situação de risco. A resposta a este efeito paradoxal é atribuída a dois fatores predominantes: primeiro, o desenvolvimento hídrico de certas áreas endêmicas, sobretudo na África, continente responsável por 80% dos índices de prevalência; o segundo fator corresponde à migração de pessoas infectadas, as quais são responsabilizadas pela expansão geográfica da doença, favorecendo, não só a sua manutenção, mas também o aparecimento de focos

urbanos, perfil que vem caracterizando a esquistossomose mansônica aguda no Brasil.

Somado aos fatores sócio-econômicos tem-se o surgimento de cepas de *Schistosoma* praziquantel-resistentes, fruto de uma constante pressão da droga em tratamentos clínicos e profiláticos.

Desta forma, inevitavelmente, a esquistossomose aproxima-se cada vez mais de um estado de descontrole, deparando-se com a necessidade de medidas urgentes e efetivas, conduzidas energicamente na busca de novas drogas, as quais constituem, na atualidade, uma necessidade imperiosa, estando franca e abertamente denunciada pela comunidade científica e pelos órgãos governamentais e não-governamentais do mundo inteiro envolvidos com o problema.

O reconhecimento desta alarmante situação foi recentemente divulgado pela OMS mediante chamadas para apoio a projetos de pesquisa que contemplassem a síntese e avaliação biológica de novos compostos com ação sobre o *Schistosoma*.

Sensibilizados por esta problemática, utilizando conceitos fundamentais de Química Medicinal, nos propomos neste trabalho a executar um programa estratégico de ações científicas e tecnológicas para contribuirmos na introdução de novos agentes esquistossomicidas.

Para tal, foi implantado no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), um conjunto de técnicas destinadas à avaliação da susceptibilidade *in vitro* de vermes adultos de *S. mansoni* frente às drogas, pelas quais são avaliados determinados parâmetros tais como mortalidade, oviposição, pareamento, motilidade e alterações morfológicas.

Conforme descrito neste trabalho, nosso objetivo consiste, especificamente, na síntese de moléculas heterocíclicas pentagonais imidazolidínicas e avaliação dos efeitos biológicos provocados em vermes adultos de *S. mansoni*, tais moléculas possuem analogia ao niridazol, protótipo da série imidazolidinona, que já foi utilizado no tratamento da esquistossomose.

Inicialmente, para um melhor entendimento da doença em termos de patogenia, diagnóstico e controle, e também do estágio atual e perspectivas da quimioterapia utilizada, faz-se necessário uma abordagem adequada sobre

distribuição geográfica e os dados epidemiológicos, assim como as características biológicas do *S. mansoni*.

Em seguida apresentamos, na forma de capítulos, os resultados obtidos até o presente e publicados ou submetidos em revistas especializadas da área. O primeiro capítulo apresenta os resultados referentes a síntese, as propriedades físico-químicas e a atividade esquistossomicida *in vitro* de novas moléculas da série 3-benzil-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona.

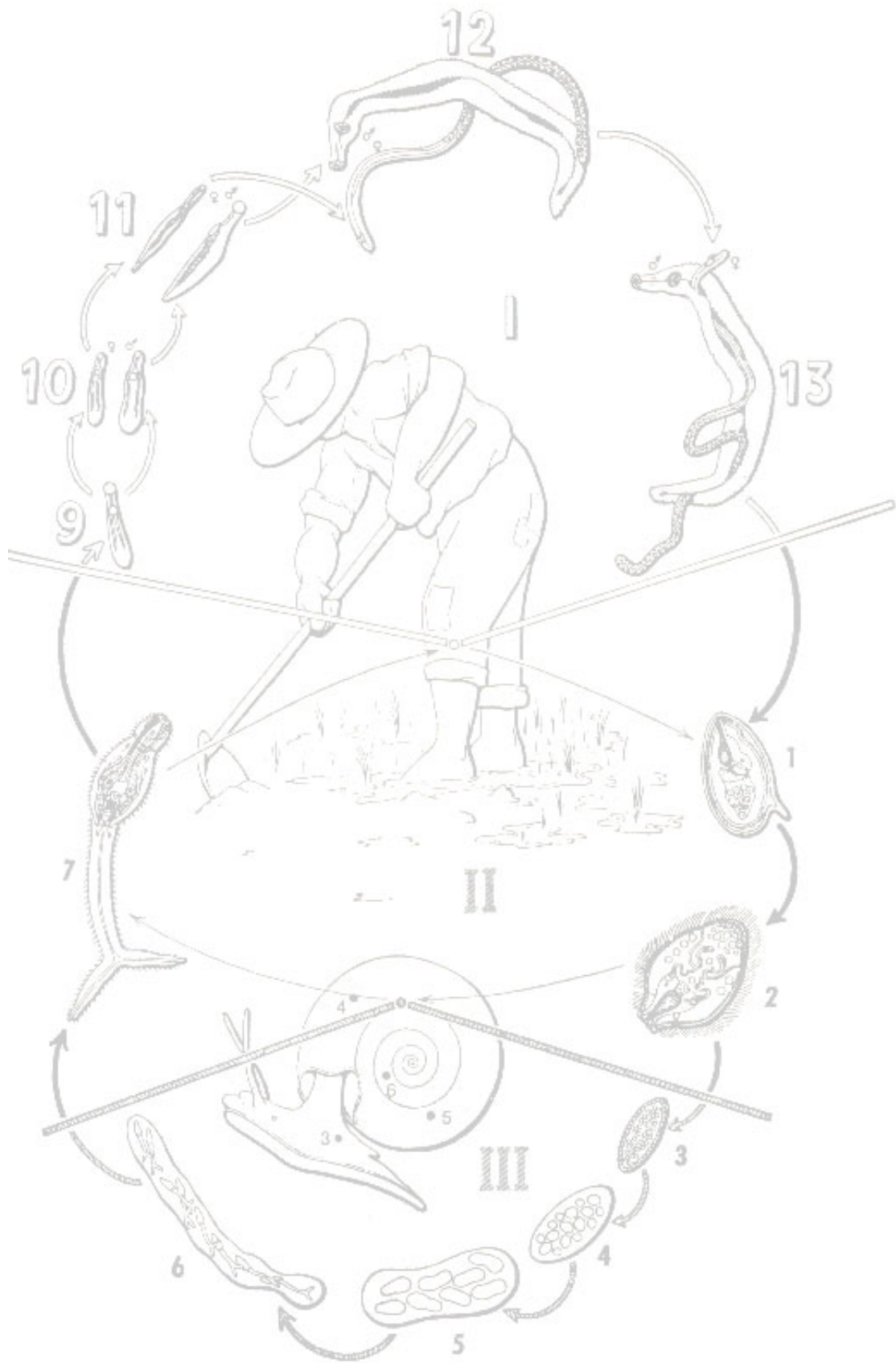
Nos segundo, terceiro e quarto capítulos encontram-se resultados relativos à susceptibilidade dos parasitas frente a análogos estruturais imidazolidinônicos que apresentam diferentes substituintes, não apenas nos anéis benzilideno e benzil, mas também no anel heterocíclico pentagonal.

No quinto capítulo demonstramos alterações ultraestruturais ocorridas no tegumento de vermes adultos de *S. mansoni* após 24 horas de tratamento com derivados imidazolidinônicos bioativos.

Em função dos efeitos de alguns derivados sobre a motilidade dos vermes de *S. mansoni*, causando em geral excitação, e diante do conhecimento da participação de receptores de neurotransmissores como alvo para ação de drogas antiparasitárias, propomos, no sexto capítulo, uma investigação sobre a atividade anticolinérgica do composto 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (FZ-4), de modo a contribuir para o esclarecimento do mecanismo de ação das moléculas estudadas para atividade esquistossomicida.

Finalmente, nos anexos, registramos os protocolos experimentais devidamente detalhados dos métodos químicos e biológicos utilizados neste trabalho, assim como os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, de massas e de infravermelho que comprovaram as estruturas das novas drogas sintetizadas. Adicionalmente, registramos a divulgação do nosso trabalho mediante apresentação oral e de pôsteres e, também, a publicação de resumos em congressos, encontros e reuniões científicas.





# ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

## 2- ESQUISTOSSOMOSE MANSONI

### 2.1- Distribuição Geográfica e Dados Epidemiológicos

A esquistossomose, também denominada bilharziose, é uma doença produzida por trematódeos do gênero *Schistosoma* que para o homem, possuem como principais agentes etiológicos as espécies *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*. Estas espécies têm diferentes distribuições geográficas, apresentando características morfofisiológicas peculiares. Cada uma possui variedades regionais, marcadas por diferenças em sua infectividade para determinadas espécies ou linhagens de moluscos vetores. A gravidade que assume a doença em muitos casos e o déficit orgânico que produz fazem da esquistossomose, depois da malária, a segunda mais importante doença tropical em termos de saúde pública.

A esquistossomose está distribuída em várias partes do mundo. O *S. haematobium* é encontrado em 53 países do Oriente Médio e da África, incluindo as ilhas Madagascar e Maurício. Existe também um foco definido de *S. haematobium* na Índia. O *S. mansoni* foi recentemente introduzido em Mauritania, Senegal e Somália, sendo agora encontrado em 54 países incluindo a Península Arábica, Egito, Líbia, Sudão, África Sub-Saariana, Brasil, algumas ilhas do Caribe, Suriname e Venezuela. O *S. intercalatum* é relatado em 10 países do cinturão da floresta tropical da África Central. O *S. japonicum* é endêmico na China, Indonésia e Filipinas, tendo sido registrado na Tailândia. O *S. mekongi* é encontrado no Camboja e Laos (WHO, 1998).

No Brasil, a esquistossomose apresenta ampla distribuição (Figura 1). As áreas endêmicas importantes estão compreendidas em uma faixa que abrange as regiões orientais do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco (Zonas do Litoral e Mata, do Agreste e do Brejo), a quase totalidade dos estados de Alagoas e Sergipe, grande parte da Bahia e de Minas Gerais, e a Zona Serrana do Espírito Santo. Focos isolados da doença já foram assinalados nos estados acima, fora das áreas de maior prevalência, bem como em outros estados, tais como: Pará,

Maranhão, Ceará, Rio de Janeiro, São Paulo, Goiás, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Rey, 2001).

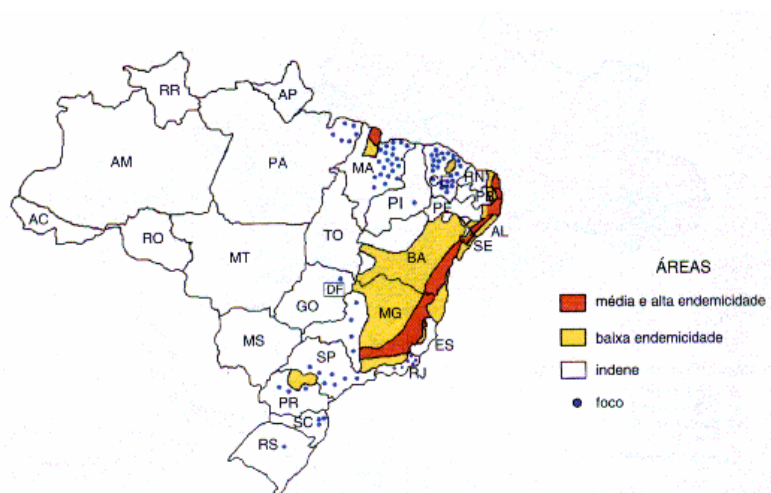


Figura 1- Distribuição geográfica da esquistossomose mansoni no Brasil, (segundo Rey 2001)

Apesar do progresso alcançado no controle, sobretudo com a quimioterapia, a doença ainda permanece endêmica em 76 países em desenvolvimento. Estima-se que no Brasil mais de 8 milhões de pessoas estejam infectadas (WHO, 1998; Katz e Peixoto, 2000).

Nos últimos 50 anos a distribuição da esquistossomose apresentou algumas mudanças em função de medidas de controle, alcançando bons resultados na Ásia, nas Américas, no Norte da África e no Oriente Médio. No Japão e em algumas ilhas das Antilhas a esquistossomose foi erradicada. Na Tunísia foi estacionada e é muito baixa no Marrocos, Filipinas, Arábia Saudita e Venezuela (Tanaka e Tsuji, 1997; WHO, 1998). Por outro lado, há locais em que a implementação inadequada do conjunto de medidas de controle, ou mesmo sua inexistência, somados ao crescimento constante da população das áreas endêmicas, são responsáveis pela manutenção dos índices estatísticos da doença. Adicionalmente, projetos hídricos em áreas endêmicas, muitas vezes, agravam o problema. Como exemplos, temos a construção de diques responsáveis por introduzir a esquistossomose urinária em novas áreas em Camarões, Costa do Marfim, Gana, Malí, Namíbia, Senegal e Sudão. Como

também a esquistossomose mansoni no Ghana, Mali, Uganda e Senegal (WHO, 1998).

No Brasil a esquistossomose urbana está traçando um novo perfil de distribuição da doença em resposta ao comportamento de migração populacional rural para áreas urbanas. No Nordeste do Brasil, tal comportamento vem sendo registrado na Região Metropolitana do Recife, imposta por uma mudança na indústria agro-açucareira, a qual vem promovendo o deslocamento de trabalhadores para a periferia das grandes cidades, onde não existe condições básicas de saneamento e moradia, favorecendo o surgimento de focos urbanos como os já registrados em São Lourenço da Mata e na Ilha de Itamaracá (Ximenes *et al.*, 2000; Barbosa, *et al.*, 2000).

## 2.2- Características Biológicas dos Vermes Adultos

Entre as cinco espécies que infectam o homem, nos deteremos no *S. mansoni*, sobretudo por ser a espécie que acomete o povo brasileiro e, também, aquela cuja susceptibilidade frente a novas drogas imidazolidinonas está sendo analisada neste trabalho.

### 2.2.1- Morfologia

Os schistosomas são helmintos díóicos e, em termos evolucionários, os representantes dos metazoos a desenvolverem mais precocemente sexos separados (Popiel, 1986).

Os vermes adultos machos de *S. mansoni* medem entre 0,6 e 1,2cm de comprimento e as fêmeas entre 1,2 e 1,6cm. São providos de ventosas, principais características dos trematódeos. Na extremidade anterior encontra-se uma ventosa oral e, a pequena distância desta, a ventosa ventral, também denominada acetábulo. O aparelho digestivo tem início com a ventosa oral através do esôfago. Na altura do acetábulo, o tubo digestivo se bifurca e, quando alcança o terço médio do corpo, reúne-se em um ceco. O macho, de cor branca,

apresenta um corpo achatado no sentido dorso-ventral da extremidade, o qual se enrola longitudinalmente formando uma fenda, conhecida como canal ginecóforo, cuja finalidade está em albergar a fêmea e fecundá-la (Figura 2).



Figura 2- Casal de *Schistosoma mansoni* em cópula

O aparelho genital masculino é formado por seis a oito massas testiculares pequenas, localizadas por trás do acetábulo, unidas por pequenos canais eferentes, a um canal deferente único, o qual forma a vesícula seminal, que se abre no início do canal ginecóforo, não havendo órgão copulador.

O verme fêmea tem o corpo cilíndrico, mais longo e mais fino que o macho. Na metade anterior do corpo, seguindo o acetábulo, tem-se a vulva, depois o útero e o ovário, e na metade posterior encontra-se a glândula vitelogênica e o ceco (Malagueño e Santana, 1994).

O tegumento que envolve a superfície externa do verme é constituído de uma membrana heptalaminar, constituída de pregas ligadas aos canais tubulares, provavelmente implicadas na absorção dos nutrientes. As ventosas oral e ventral do *S. mansoni* são densamente cobertas com espinhos, também chamados espículos. Os vermes machos apresentam numerosos tubérculos repletos de espinhos em sua superfície. Tais tubérculos estão ausentes no canal ginecóforo e também nas fêmeas. As fêmeas têm um corpo liso, mas apresentam muitos espinhos na porção posterior final e na porção anterior. Também são verificados a presença de papilas sensoriais distribuídas no tegumento dos vermes (Miller *et al.*, 1972). Os espinhos são constituídos de actina cristalina, cuja base está sobre

a membrana basal do epitélio sincicial e seus ápices projetam-se acima da superfície, mas geralmente estão revestidos pela membrana plasmática externa (Cohen, 1982; Coles, 1984; Schmidt e Roberts, 1989).

A superfície do verme adulto de *S. mansoni* é constituída por um epitélio sincicial anucleado, conectado através de microtúbulos com as conexões citoplasmáticas e os corpos nucleares subjacentes à cadeia de fibras musculares. Os maiores corpos de inclusões do epitélio sincicial, os corpos discóides e corpos multilamelares, ocorrem nas células subsinciciais, onde parecem estar envolvidos com a formação da membrana plasmática apical e do envelope subjacente, componentes que formam um complexo de dupla membrana que recobre o sincício (McLaren e Hockley, 1977).

O processo de síntese e reparo da membrana plasmática apical e do envelope subjacente são considerados a principal adaptação de proteção dos vermes, em resposta aos danos causados pelos componentes imunes do hospedeiro (Bentley *et al.*, 1981; Capron *et al.*, 1982). Zhou e Podesta (1989) verificaram o efeito da serotonina e do componente C<sub>3b</sub> da cascata de complemento em estimular a síntese e o “turnover” da membrana plasmática apical e do envelope, respectivamente.

### 2.2.2- Ciclo Biológico

O *S. mansoni* desenvolve um ciclo evolutivo do tipo heteroxênico, com passagem de formas evolutivas em dois hospedeiros: um definitivo, o homem ou alguns vertebrados, onde se processa a reprodução sexuada, e outro, o hospedeiro intermediário, moluscos do gênero *Biomphalaria*, no qual se observa a reprodução assexuada. O meio aquático é um ambiente obrigatório na evolução do parasito e onde são encontradas as formas infectantes para ambos os hospedeiros (Pessoa e Martins, 1977).

Os hospedeiros intermediários do *S. mansoni* são moluscos pulmonados de água doce, hermafroditas, pertencentes a família Planorbidae, caracterizada por ter a concha enrolada em espiral plana e, por essa razão, conhecidos por planorbídeos. Das várias espécies de moluscos existentes em nosso meio e

capazes de se infectarem com o *S. mansoni*, três são encontrados com maior frequência: *B. glabrata*, *B. straminea* e *B. tenagophila*. Estes planorbídeos criam-se e vivem em coleções aquáticas onde há pouca correnteza, alimentando-se da vegetação aquática, algas e restos de vegetais mortos. A partir de 30 dias de idade, o molusco atinge a maturidade sexual e ovipõe. Os ovos são contidos em massas gelatinosas denominadas desovas, as quais podem conter até mais de 100 unidades (Malagueño e Santana, 1994).

No hospedeiro definitivo, os vermes adultos de *S. mansoni* habitam o sistema porta-hepático. Os schistosomas adultos acasalam-se antes da maturação reprodutiva da fêmea, permanecendo nestas condições pelo resto da vida. O completo crescimento da fêmea, a morfogênese reprodutiva, e a manutenção da respectiva função reprodutiva, está na dependência desta associação. O pareamento é também um pré-requisito para migração dos vermes da veia porta-hepática para as veias mesentéricas (Popiel, 1986).

Na veia mesentérica inferior, principalmente ao nível da parede intestinal do plexo hemorroidário superior, ocorre a postura dos ovos. Cada fêmea, com idade de até dois anos, põe cerca de 400 ovos por dia. Os ovos são postos na submucosa intestinal. Neste momento, eles são imaturos e gradativamente atingem a maturidade, a medida que o saco embrionário evolui para dar origem ao miracídio, larva ovalada ciliada, que caracteriza o ovo maduro (Coelho, 1970). Durante o processo de maturação, os ovos avançam em direção à luz intestinal em um período que perdura, de um mínimo de seis, a um máximo de vinte dias.

Os ovos maduros que não alcançam a luz intestinal sofrem com a morte dos miracídios, podendo ficar presos na mucosa intestinal. Como a postura nem sempre se dá na intimidade da mucosa do intestino, muitos ovos são arrastados através da corrente sangüínea para o fígado e o baço, iniciando assim o processo inflamatório granulomatoso nesses órgãos. Aqueles que galgam até a luz do intestino, chegam ao exterior junto com o bolo fecal. Quando em contato com o meio aquático, e estimulados por fatores ambientais, como temperatura em torno de 28°C, luminosidade solar intensa e oxigenação da água, os ovos libertam o miracídio (Standen, 1952).

Os miracídios nadam ativamente em busca de hospedeiros intermediários, nestes transformam-se em esporocistos de primeiro estágio, os quais por

reprodução assexuada darão de 150 a 200 esporocistos secundários, que migram para as glândulas digestivas e ovoteste, originam numerosas larvas denominadas cercárias. Após um mês de infecção do molusco, por este processo de expansão clonal, cerca de 100.000 cercárias são produzidas originárias de um único miracídio. A emergência das cercárias ocorre sob efeito da temperatura e luminosidade. Desta forma, nas horas mais quentes e mais luminosas do dia se verificam picos mais elevados de liberação cercariana. As cercárias vivem por até 48 horas, apresentando maior atividade nas primeiras 8 horas de vida. As cercárias nadam ativamente e quando alcançam a pele do homem, fixam-se de preferência nos folículos pilosos apoiando-se pela ventosa oral. Em seguida, através de ação lítica das glândulas de penetração e ação mecânica em função de movimentos vibratórios intensos, promovem a penetração do corpo cercariano e a concomitante perda da cauda.

Após a penetração, as larvas resultantes, denominadas esquistossômulos, migram pelo tecido subcutâneo e penetram na circulação sangüínea, havendo também a possibilidade de migração por via linfática. Os esquistossômulos se dirigem para o sistema porta-hepático, local onde se desenvolvem, transformando-se em vermes adultos 30 dias após a penetração. Daí migram, acasalados, para o território da veia mesentérica inferior onde farão oviposição. Os primeiros ovos são vistos nas fezes em torno de 40 dias após a infecção do hospedeiro. Desta forma, resumidamente, está instalada a doença (Rey, 2001).

### 2.2.3.- Neurotransmissores

O sistema nervoso dos platelmintos, ou vermes chatos, trematódeos e cestódeos, aos quais pertencem as espécies do gênero *Schistosoma*, apresenta dois principais interesses. Um deles é a sua posição evolucionária única e, mediante seu conhecimento, pode fornecer informações úteis para o entendimento dos sistemas nervosos em geral. O segundo aspecto, de interesse químico-medicinal, concerne ao controle, e mesmo a erradicação, das doenças parasitárias através da pesquisa de novos quimioterápicos que atuem em



receptores específicos do sistema nervoso dos vermes, com um mínimo de efeito colateral para o hospedeiro (Halton e Gustafsson, 1996).

O sistema nervoso do *S. mansoni* tem recebido muita atenção nas últimas décadas, sobretudo pelo fato de representar um ponto de ataque para novas drogas. Existem atualmente razoáveis evidências sugerindo que a 5-hidroxitriptamina (5-HT) funciona como neurotransmissor excitatório, causando aumento da atividade motora desse parasita (Bennett *et al.*, 1969; Hillman e Senft, 1973). À acetilcolina, por outro lado, é atribuída uma função de neurotransmissor inibitório, causando paralisia flácida (Barker *et al.*, 1966; Fetterer *et al.*, 1977). As catecolaminas têm sido relatadas como neurotransmissores inibitórios, mas seu papel específico em *S. mansoni* ainda permanece incerto (Bennett e Bueding, 1971; Hillman e Senft, 1973)

Um importante trabalho desenvolvido por Mellin e colaboradores (Mellin *et al.*, 1983) demonstrou que a atividade motora de vermes adultos de *S. mansoni* era fortemente estimulada pela 5-HT a 0,1mM. Este efeito ocorreu imediatamente após a aplicação da 5-HT ao meio, mas diminuiu com o tempo e em concentrações mais altas. Observaram também que agentes bloqueadores, como a metergolina e a cipro-heptadina, produzem uma inibição da atividade motora produzida pela 5-HT.

Não apenas a acetilcolina, mas também os agentes colinomiméticos arecolina e carbacol produzem paralisia flácida em vermes adultos machos e fêmeas de *S. mansoni* mantidos *in vitro*. Mellin e colaboradores (1983) mostraram que a atividade elétrica extracelular deste parasita cessa imediatamente após tratamento com 0,1mM de carbacol, mesmo na presença de uma concentração estimulante de 5-HT.

As diferenças estruturais e funcionais do sistema nervoso do *S. mansoni* são exploradas nas drogas de reconhecida atividade antiparasitária, como o metrifonato, cuja atividade esquistossomicida, provocando paralisia flácida nos vermes, qualitativamente similar àquela provocada pelo carbacol e arecolina, é atribuída a sua ação inibidora da enzima acetilcolinesterase, pioneiramente demonstrado por Bueding (1952) e posteriormente por Barker e colaboradores (1966).

Os esquistossomicidas hicantone e oxamniquine, produtos do metabolismo oxidativo do pró-fármaco lucantone, como esperado, uma vez que possuem estruturas químicas similares (Figura 3), apresentam mesmo mecanismo de ação. A diferença entre a estrutura química do lucantone e do hicantone consiste apenas na presença do grupo hidroximetil nesta última em lugar do metil no lucantone.

Observa-se que a estrutura química do oxamniquine e do hicantone consistem, em relação ao grupo hidroximetil presente em ambas, de uma cadeia lateral dialquilamino-etilamina em posição *para* e de um grupo nitro (oxamniquine) e do enxofre (hicantone) em posição *orto*. Ambas as drogas são ativas em infecções provocadas pelo *S. mansoni*, mas ineficazes em *S. japonicum*; também mostram-se mais ativas nos vermes machos do que nos fêmeas e baixa atividade em formas imaturas (Cioli *et al.*, 1995).

Devido ao aumento de motilidade de vermes adultos de *S. mansoni* mantidos *in vitro* em presença de baixas concentrações de hicantone e oxamniquine, Hillman e colaboradores (1975, 1978) sugeriram um efeito anticolinérgico desses fármacos. Em adição, o hicantone pode também bloquear a paralisia provocada pelo carbacol (Hillman e Gibler, 1975).

Posteriormente, um trabalho desenvolvido por Pica-Mattocchia e Cioli (1986) demonstrou que a atividade esquistossomicida do hicantone, embora atuando em receptores da acetilcolina, não era atribuído apenas ao seu efeito anticolinérgico.

Atualmente existem fortes evidências de que o mecanismo de ação do hicantone e do oxamniquine esteja relacionado com a inibição irreversível da síntese de ácidos nucleicos de schistosomas sensíveis (Cioli *et al.*, 1995), conforme sugerido inicialmente por Neame e colaboradores (1978).

### 2.3- Patogenia

As lesões que ocorrem no organismo parasitado pelo *S. mansoni* são decorrentes, tanto da agressão direta do parasito ou de seus elementos, quanto da resposta do hospedeiro a tais agressões (Prata, 1996). Adicionalmente, a intensidade do processo patológico no organismo do hospedeiro varia

consideravelmente de acordo com uma série de circunstâncias, tais como a linhagem do parasito, a carga parasitária infectante, a frequência com que ocorrem as infecções, a idade, o estado nutricional e a resposta imunológica do hospedeiro, a carga parasitária acumulada ao longo dos anos e a duração da infecção. Entre estes, a carga parasitária e a resposta imunológica são considerados os fatores mais importantes (Rey, 2001).

As alterações patológicas no hospedeiro são estabelecidas à medida em que se dá a evolução biológica do parasito. Com a penetração das cercárias surgem a chamada dermatite cercariana, um processo imuno-inflamatório caracterizado por sensação de comichão, erupção urticariforme seguidos por eritema, edema, pequenas pápulas e dor. É mais intensa nas reinfecções, onde há interferência de mastócitos, complemento, eosinófilos e IgE.

Durante a migração dos esquistossômulos através da circulação sangüínea até atingir o sistema porta-hepático podem ocorrer linfadenia generalizada, febre, aumento volumétrico do baço e sintomas pulmonares, mas não raro, há pacientes assintomáticos.

Os vermes adultos podem provocar lesões graves, embora circunscritas, sobretudo no fígado. São também responsáveis por ocasionar espoliações no hospedeiro devido ao seu alto grau de metabolismo. Os ovos são considerados o principal fator patogênico na esquistossomose. Geralmente, somente uma pequena percentagem dos ovos depositados na submucosa intestinal atinge a luz do intestino e é eliminada pelas fezes. Uma parte fica retida na parede do intestino e outra é arrastada para o fígado através da corrente circulatória. Os ovos imaturos vivos aparentemente não provocam reação tecidual, sendo absorvidos por macrófagos após a morte. Já os maduros produzem reação inflamatória granulomatosa, a qual constituirá o característico granuloma esquistossomótico. Durante o percurso, até atingir a luz intestinal, os ovos vão estabelecendo lesões, assim, quando em número pequeno, as lesões são mínimas havendo rápida reparação tecidual, quando em grande número podem provocar hemorragias, edemas da submucosa e ulcerações.

As principais manifestações clínicas da esquistossomose ocorrem em 10% da população infectada. Aumento volumétrico do fígado e do baço e varizes esofagianas estão relacionadas à hipertensão portal causada pela fibrose

hepática, conhecida como fibrose de Symmers. A doença pode evoluir, dependendo da intensidade da infecção e de outros fatores, para hemorragia gastrointestinal alta por rompimento das varizes esofágicas, ascite e anemia (Prata, 1996).

#### 2.4- Diagnóstico

Em função da inespecificidade e da inconstância dos sinais e sintomas da esquistossomose, somente provas laboratoriais podem fornecer elementos seguros para justificar o diagnóstico. São disponíveis dois tipos de exames: demonstração da presença de ovos nas fezes ou nos tecidos do paciente e a realização de provas imunológicas.

O exame de fezes pode ser feito utilizando-se o método preconizado por Hoffman, Pons e Janer (1934), o qual representa uma técnica qualitativa de sedimentação espontânea. O método de Kato-Katz (Katz *et al.*, 1972), o qual é constituído por uma técnica quantitativa que indica o número de ovos por grama de fezes, dá informação sobre a intensidade da infecção. Quando a infecção é moderada ou intensa, isto é, o número de ovos por grama de fezes é igual ou maior a 120, estes métodos dão resultados satisfatórios. Todavia, quando a infecção é leve, 24 a 96 ovos por grama de fezes, há necessidade de repeti-los (Pereira, 2000; Rey, 2001). Embora a técnica qualitativa de diagnóstico apresente uma sensibilidade boa em detectar a infecção, a técnica quantitativa é recomendada, pois reflete a intensidade, tornando possível avaliar os indicadores úteis no controle tais como a existência de fatores de risco, presença de formas clínicas severas, grau de transmissão na área, percentual de cura e reinfecção (Rabello, 1997).

As técnicas imunológicas medem a resposta do organismo do hospedeiro frente aos antígenos do parasito. Em função da complexidade da composição antigênica do *S. mansoni* nas suas diversas fases de evolução, torna-se necessário determinar quais dos antígenos têm importância em determinada fase da infecção, para então ser utilizado nas reações sorológicas.

Várias técnicas imunológicas são disponíveis, mas nenhuma atende todas as exigências: efetividade, facilidade e rapidez para execução, assim como a utilização de equipamentos simples para utilização no campo.

A ocorrência de reações cruzadas, principalmente com outras helmintoses, e a impossibilidade de detectar a intensidade da infecção deixam as técnicas sorológicas em segundo plano no diagnóstico da esquistossomose sendo o exame parasitológico o mais largamente aplicado (Rey, 2001; Rabello, 1997).

Alguns autores salientam que os métodos imunológicos são justificados apenas em áreas de baixa carga parasitária nas quais existem diminuição da eficiência dos exames parasitológicos (Rey, 2001).

Os métodos de imunodiagnóstico são classificados geralmente em indiretos e diretos. Os métodos indiretos são a maioria dos testes sorológicos e a sua positividade não indica doença pois, somente correspondem a uma resposta do sistema imune do hospedeiro frente a alguns antígenos parasitários. O método direto é utilizado como critério de cura; o paciente, uma vez curado, não apresenta mais positividade (Coelho e Tavares, 1991). São eles: a) Testes alérgicos: intradermorreação; b) Testes que utilizam ação *in vitro* do soro imune sobre formas evolutivas do parasita, tais como o teste de aglutinação cercariana, reação circunovular, reação pericercariana e reação de imobilização do miracídio; c) Testes que detectam imunoglobulinas específicas como reação de hemaglutinação, reação de imunofluorescência, método imunoenzimático ou ELISA; d) Teste que detecta antígenos presentes no soro através de anticorpos monoclonais ligados à placa de microtitulação: ELISA de captura.

Já está estabelecido que os métodos imunoenzimáticos apresentam maior sensibilidade que os demais métodos, com a vantagem dos reagentes apresentarem maior estabilidade e serem mais econômicos. O ELISA de captura de antígeno é capaz de indicar se o paciente está com a doença ativa e é um ótimo controle de cura, pois após quimioterapia os vermes estão mortos e não secretam o antígeno, tornando-se a técnica negativa dez dias após o uso da medicação.

## 2.5- Controle

O controle da esquistossomose permanece um desafio para muitos países endêmicos. Apesar dos esforços para atingir o controle, a doença continua sendo uma das infecções parasitárias mais prevalentes do mundo e um problema de saúde pública mundial, atrás somente da malária nos países tropicais e subtropicais (Savioli *et al.*, 1997).

A estratégia básica de controle a utilizar, quando não se apresentam dificuldades particulares, consiste em reduzir ou impedir a transmissão do parasito, mediante o uso de moluscicida, saneamento ambiental, educação sanitária, etc. Por outro lado, enquanto permanecerem os efeitos do controle da transmissão, deve-se proceder ao tratamento da população parasitada para reduzir drasticamente as fontes de infecção, isto é, fazer tratamentos em massa ou quimioterapia simultânea de todos os indivíduos de uma área que se encontrem infectados (Rey, 2001).

No Brasil, os programas de intervenção de grande abrangência apenas tiveram início em 1975 quando foi introduzido o Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE) objetivando controlar a doença, sobretudo no Nordeste. A metodologia inicial aplicada foi baseada na realização de grandes inquéritos populacionais, baseados em exames coproscópicos e no posterior tratamento em massa (Barbosa e Barbosa, 1995).

Em 1980, o PECE deixou de ser um programa especial e passou a ser denominado simplesmente de Programa de Controle da Esquistossomose (PCE). Avaliações do desenvolvimento desses programas, com a realização de exames coproscópicos, permitiram identificar que, logo após o tratamento, ocorreram reduções nos índices de prevalência, mas também revelaram que, nos anos subseqüentes, esses índices elevaram-se novamente pela reinfecções das populações tratadas (Carvalho *et al.*, 1998). Sturrock (1989) chama a atenção para este fato, considerando que as medidas de controle devem ser adotadas sistematicamente para que se obtenha significativa diminuição na prevalência e incidência, pois caso contrário a transmissão é no máximo interrompida temporariamente e as reinfecções são inevitáveis.

Em 1989, com a criação da Fundação Nacional de Saúde, o PCE foi extinto e surgiu o Programa para Controle de Doenças Endêmicas no Nordeste (PCDEN). Mais uma vez as propostas não foram efetivamente implementadas e, como conseqüência, o controle da esquistossomose está distante de ser alcançado. Exemplo disto foi registrado na Zona da Mata Sul de Pernambuco, em um estudo envolvendo 17 municípios onde em nenhum deles foi atingida a meta preconizada pelo PCDEN de que 80% das localidades dos municípios apresentassem índices de positividade inferiores a 5% (Carvalho *et al.*, 1998).

Registra-se uma importante observação de Barbosa (1996), na qual declara "As situações de transmissão da esquistossomose são tão variadas como são a ecologia e os grupos sociais nos quais ela ocorre. A prevalência e a intensidade da infecção nas comunidades afetadas pela doença estão sujeitas à variações relacionadas à práticas culturalmente moldadas pelas atividades econômicas, de lazer ou domésticas, que são peculiares em cada localidade. As medidas de controle deveriam contemplar essa diversidade, se almejam lograr eficiência nas suas ações".



## **DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS**



### 3- DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS

A quimioterapia contra a esquistossomose iniciou-se em 1918, época em que Christopherson relatou um tratamento com êxito da doença utilizando tártaro emético (tartarato de antimônio e potássio) (Christopherson, 1918). Os compostos de antimônio já eram, desde a antiguidade, mencionados em papiros médicos com o nome *msdmt*, indicados para o tratamento da hematúria, provavelmente causada pelo *S. haematobium*. Durante cinquenta anos os compostos antimoniais compuseram o arsenal da quimioterapia esquistossomicida (Figura 3), mas a intensidade de efeitos colaterais os tornaram obsoletos. Nestes estavam incluídos sérias reações como desconforto subesternal, síncope cardiovascular fatal e sintomas anafilactóides. Além disso, dores severas ocorriam se a droga acidentalmente escapasse para o tecido perivascular com possível subsequente ulcerações da pele. Desta forma, muitos pacientes abandonavam a terapia por falta de tolerância e/ou obediência (Cioli *et al.*, 1995).

Além do seu valor histórico, os antimoniais merecem menção porque eles foram a primeira classe de compostos para a qual um mecanismo de ação foi proposto. Esta classe de compostos inibe a fosfofrutoquinase, enzima que catalisa a conversão de frutose-6-fosfato para frutose-1,6-difosfato, interferindo com a glicólise nos schistosomas (Bueding e Mansour, 1957).

No período em que os antimoniais representavam a única intervenção terapêutica para a esquistossomose, uma segunda droga foi utilizada no tratamento do *S. japonicum*, a emetina. Apesar de ter apresentado boa eficácia, demonstra baixo índice terapêutico. Um breve renascimento à quimioterapia esquistossomicida foi trazido com a introdução da 2,3-di-hidroemetina, cuja toxicidade correspondia à metade daquela apresentada pelo composto protótipo. Todavia, o procedimento de administração, exigindo hospitalização com injeções diárias, conduziu-a ao abandono como agente esquistossomicida.

Os antimoniais foram realmente os únicos esquistossomicidas disponíveis até o final da Segunda Guerra Mundial, quando o lucantone, ou 1-[2-(dietilamino)-etilamino]-4-metil-9H-tioxanten-9-ona, foi introduzido na prática clínica (Cioli *et al.*, 1995). Este surgiu de uma iniciativa da indústria farmacêutica Bayer em apoiar um

programa sistemático para pesquisa de agentes esquistossomicidas, iniciado em 1938 por Kikuth e Gönner (Kikuth e Gönner, 1948). Um composto ativo chamado Miracil A foi sintetizado em agosto de 1938 e, nos anos subsequentes, três outros compostos da mesma série, Miracil B, C e D foram obtidos e testados. O Miracil D foi então introduzido na prática clínica com o nome genérico de lucantone.

O lucantone foi efetivo no *S. mansoni* e no *S. haematobium*. Os efeitos colaterais usuais foram limitados a náusea e vômitos, mas alterações cardiovasculares e no SNC ocorriam ocasionalmente.

Em 1964, o niridazol, ou 1-(5-nitro-2-tiazolil)-2-imidazolidinona, foi introduzido pela Ciba-Geigy com o nome Ambilhar<sup>®</sup> (Lambert, 1964). Este fármaco recebeu considerável atenção, certamente por constituir uma outra alternativa em relação aos antimoniais. Adicionalmente, apresentava a vantagem de ser administrado oralmente. Por outro lado, o niridazol apresentou sérias desvantagens, tais como a necessidade de múltiplas doses e a ocorrência de efeitos colaterais indesejáveis; entre estes, é relatado toxicidades central e renal, mutagenicidade, carcinogenicidade, embriotoxicidade e imunossupressão celular (Webster Jr. *et al.*, 1975; Urman *et al.*, 1975). Posteriormente esta atividade imunossupressora foi atribuída ao metabólito 1-tio-carbamoil-2-imidazolidinona isolado da urina de roedores e de pacientes tratados (Tracy *et al.*, 1980). Este composto foi o produto do metabolismo reductivo carregado por bactérias anaeróbias e também pelo *S. mansoni* adulto (Catto *et al.*, 1984).

As três espécies principais de schistosoma mostraram-se sensíveis ao niridazol, mas as melhores taxas de cura foram encontradas com o *S. haematobium*, 80-100%, enquanto que a resposta do *S. mansoni* foi de 30-70% e do *S. japonicum* em torno de 50% (Cioli *et al.*, 1995).

A hipótese para o mecanismo de ação do niridazol foi proposta por Tracy e colaboradores (1983). Esses autores incubaram schistosoma adulto na presença de [<sup>14</sup>C]-niridazol e mostraram que a droga não somente foi captada pelo verme, mas se ligou covalentemente à macromoléculas do parasita. Os mesmos autores mostraram que em presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) e em condições anaeróbicas, o grupo nitro do niridazol é reduzido enzimaticamente. Sob condições aeróbicas ou na ausência de NADPH não ocorre atividade nitro-redutase, nem ligação covalente. Estes resultados indicam que a

nitro-redução do niridazol é essencial para formação de intermediários reativos capazes de se ligarem covalentemente à macromoléculas do schistosoma.

Ainda na década de 1960, o metrifonato (Bilarcil<sup>®</sup>), composto obtido da purificação do triclorfon, um organofosforado cuja atividade anticolinesterásica sobre helmintos foi observada no final dos anos 1950, foi introduzido na clínica mostrando uma consistente atividade sobre *S. haematobium*.

O metrifonato, quimicamente o ácido dimetil-éster 2,2,2-tricloro-1-hidroxietil fosfônico, é instável em solução aquosa e é espontaneamente transformado em vários compostos, entre eles tem-se o diclorvos (2,2-diclorovinil dimetil fosfato). Evidências sugerem que o diclorvos é, na verdade, a molécula bioativa, enquanto o pró-fármaco metrifonato atua essencialmente como uma droga bem tolerada e apta para formulação de liberação lenta (Nordgren *et al.*, 1980). Estudos químicos revelam que o grupo diclorovinil do diclorvos é importante para transesterificação com grupo álcool de resíduos da serina em proteínas, e que este tipo de esterificação no sítio ativo da acetilcolinesterase é responsável pela atividade inseticida e anti-helmíntica do diclorvos. Como inibidor da acetilcolinesterase, este é no mínimo 100 vezes mais potente do que o metrifonato. Desde que o metrifonato é espontaneamente convertido para diclorvos, é possível que, a atividade inibitória do metrifonato seja devido a sua transformação em diclorvos (Hofer, 1981).

Os nitrofuranos, drogas de interesse inicial na bacteriologia, tiveram sua atividade esquistossomicida explorada no início dos anos 1960 por pesquisadores chineses frente a infecções com *S. japonicum*, tanto em animais como em humanos. Um exemplo desse grupo, o furopromidium, foi amplamente usado na China, mas a toxicidade deixou no abandono esta classe de nitrofuranos (Cioli *et al.*, 1995).

Com a exposição do lucantone à ação do *Aspergillus sclerotiorum*, um derivado 4-hidroximetil foi isolado e nomeado hicantone, ou 1-[2-(dietilamino)-etilamino]-4-hidroximetil-9H-tioxanten-9-ona, mostrando-se mais efetivo do que lucantone frente a schistosoma (Rosi *et al.*, 1965). A atividade motora do *S. mansoni* é estimulada quando expostos *in vitro* a concentrações de hicantone entre 1-10µM/mL (Senft e Hillman, 1973). Esta atividade foi atribuída ao efeito anticolinérgico da droga, consistindo de um bloqueio de receptores da acetilcolina,

com conseqüente supressão do efeito inibitório do neurotransmissor (Hillman e Senft, 1975). O hicantone também promove inibição irreversível da síntese de ácidos nucléicos em vermes sensíveis e inibição transitória naqueles schistosomas resistentes, assim como em *S. japonicum* (Pica-Mattoccia e Cioli, 1983). A necrose hepática aguda ocorrida 2 a 5 dias após tratamento com hicantone foi o efeito colateral que limitou o seu uso, principalmente nos tratamentos em massa.

O oxamniquine, ou 6-hidroximetil-2-isopropilaminometil-7-nitro-1,2,3,4,-tetra-hidroquinolina, produto da oxidação microbiológica do UK3883 pelo *Aspergillus sclerotiorum*, foi revelado também graças ao programa de pesquisa iniciado por Kikuth e Gönnert. O UK3883 é o metabólito ativo do Mirasan, um composto análogo estrutural do lucantone que fora proposto e que se mostrou ativo nas pesquisas desenvolvidas pela indústria Bayer (Richards e Foster, 1969).

Foi observado que o oxamniquine exerce efeito de bloqueio dos receptores da acetilcolina e inibição irreversível da síntese de ácidos nucléicos, tal qual ocorre com o hicantone (Pica-Mattoccia e Cioli, 1983).

O controle da esquistossomose ganhou novo impulso com a introdução do praziquantel, quimicamente o 2-ciclo-hexilcarbonil-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-pirazino-[2,1-a]isoquinolin-4-ona fármaco que surgiu das investigações da Bayer no início da década de 1970 ao estudar a atividade anti-helmíntica de compostos tranquilizantes (Seubert *et al.*, 1977; Groll, 1984). Atualmente o praziquantel é a droga de escolha para o tratamento da esquistossomose, e isso se deve a razões como: alta eficácia contra todas espécies de *Schistosoma*, ausência de efeitos colaterais sérios, administração de dose oral única, custo competitivo e larga experiência clínica mostrando que ele é seguro, efetivo e fácil de administrar.

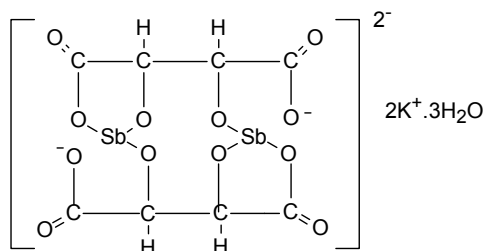
O praziquantel induz o influxo de cálcio através do tegumento e das células musculares do schistosoma causando contração imediata. Há evidências que sugerem que o tegumento dos vermes contêm sítios sensíveis ao praziquantel. Como o tegumento do verme está eletricamente ligado às células do músculo, um aumento no cálcio intrategumentar pode conduzir a um aumento do cálcio no retículo sarcoplasmático, promovendo assim a referida contração muscular (Thompson *et al.*, 1982). Estes autores também demonstraram a presença de sítios sensíveis ao praziquantel nas células musculares, uma vez que

schistosomas desprovidos de tegumentos contraem-se na presença desta droga. A relação entre o praziquantel e o influxo de cálcio sugere, portanto, que o sítio de ação são canais permeáveis ao íon cálcio nas membranas do tegumento e das células musculares.

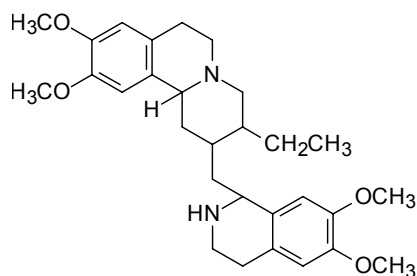
Paralelamente ao efeito sobre os músculos do verme, ocorrem alterações morfológicas, tais como vacuolização do sincício tegumentar e a formação de bolhas na superfície do tegumento (Xiao *et al.*, 1984).

As lesões provocadas no verme resultam na exposição de antígenos e a conseqüente penetração das células de defesa em seu interior. O resultado final é a formação de granulomas, nos quais os vermes são posteriormente destruídos (Doenhoff *et al.*, 1987). A atividade sinérgica do praziquantel com anticorpos é atribuída a ligação destes à epítomos expostos, aumentando desta forma a morte dos vermes (Fallon *et al.*, 1992).

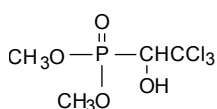
Apesar do importante passo dado há vinte e cinco anos no tratamento clínico da esquistossomose, na ocasião da introdução na terapêutica do praziquantel, ainda hoje no mundo, das 200 milhões de pessoas infectadas, 120 milhões são sintomáticas e 20 milhões desenvolvem a forma grave da doença (WHO, 1998). Como conseqüência da utilização em massa e praticamente exclusiva do praziquantel na maioria das áreas endêmicas, havendo apenas o oxamniquine como segunda escolha e apenas para as infecções causadas pelo *S. mansoni*, um perigo potencial tem surgido: a emergência daquelas cepas de *Schistosoma* praziquantel-resistentes (Stelma *et al.*, 1995; Stelma *et al.*, 1997; Ismail *et al.*, 1999; Liang *et al.*, 2001) e oxamniquine-resistentes (Cioli *et al.*, 1992).



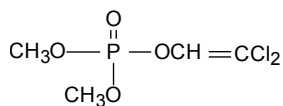
Tártaro emético



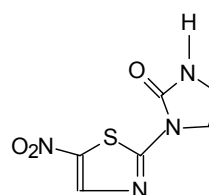
2,3-Di-hidroemetina



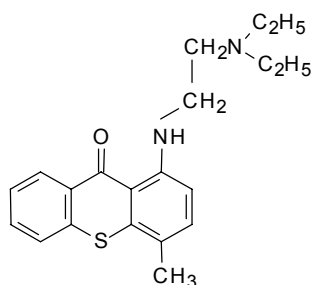
Metrifonato



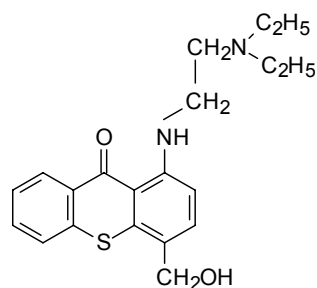
Diclorvos



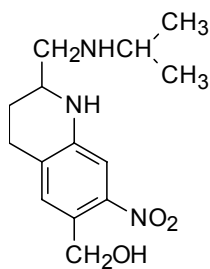
Niridazol



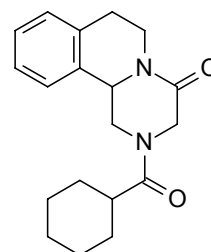
Lucantone



Hicantone



Oxamniquine



Praziquantel

Figura 3: Estruturas químicas de esquistossomicidas



## **RESISTÊNCIA AOS ESQUISTOSSOMICIDAS**

#### 4- RESISTÊNCIA AOS ESQUISTOSSOMICIDAS

Resistência é usualmente definida como perda, geneticamente transmitida, da sensibilidade em uma população de parasitos que foi previamente sensível a uma determinada droga. A falta de sensibilidade em uma população previamente não exposta é freqüentemente denominada tolerância (Cioli *et al.*, 1993).

Um aspecto crucial para a evolução da resistência nos helmintos é a inexistência ou insensibilidade de métodos para detectar o seu desenvolvimento. Desta forma, muitos casos não são detectados em estágios iniciais, reduzindo, ou mesmo anulando, a possibilidade do processo ser revertido. Para evitar aumento nos níveis de resistência, recomenda-se prosseguir a terapia com sensatez ou retirar totalmente a droga. No caso de drogas como o praziquantel, esta última atitude é difícil de ser tomada, pois ele representa a única droga utilizada na esquistossomose africana e oriental (Bennett *et al.*, 1997).

O primeiro caso bem documentado de resistência a uma droga esquistossomicida foi apresentado por Rogers e Bueding (1971). Especificamente, estes autores demonstraram que o hicantone quando administrado em baixas doses a camundongos produziram progenies altamente resistentes. A resistência foi associada a uma cepa isolada do parasito não tendo sido reproduzida em outras cepas. Em populações, cepas resistentes ao hicantone e ao oxamniquine foram pioneiramente evidenciadas no Brasil por Katz e colaboradores (Katz *et al.*, 1973) e posteriormente por Campos e colaboradores (Campos *et al.*, 1976). Coles e colaboradores (1987) verificaram, em estudos no Kenya, a necessidade de se usar doses maiores de oxamniquine, levando a observação da presença de vermes resistentes, até mesmo antes da quimioterapia extensiva ter sido aplicada.

Partindo das observações iniciais de Rogers e Bueding, citadas anteriormente, Cioli e colaboradores (1992) demonstraram como vermes resistentes ao hicantone escapavam da inibição irreversível da síntese de ácidos nucléicos. Para isso, realizaram cruzamentos genéticos com linhas homozigotas puras. A análise da  $F_1$ ,  $F_2$  e cruzamentos posteriores mostraram que a resistência é controlada por um único gene, autossômico e recessivo. Sobre esta evidencia



foi mostrado que schistosomas resistentes carecem de uma atividade que, em vermes sensíveis, é essencial para o desenvolvimento da ação da droga. Esta seria a ativação de uma sulfotransferase capaz de metabolizar o hancantone, e também o oxamniquine, para um éster reativo, o qual produz um íon carbonium capaz de alquilar o DNA, causando dano irreversível no metabolismo do ácido nucléico e morte do verme.

A existência de cepas de schistosoma resistentes ao praziquantel foram relatadas no Senegal onde são intensos os focos de *S. mansoni* (Stelma *et al.*, 1995). Observou-se que vinte semanas após o tratamento de uma amostra aleatória da população daquela região, mostrando elevada carga parasitária e utilizando-se a dose padrão de 40 mg/kg, a taxa de cura foi somente de 18%. Em adição a estes dados, efeitos colaterais severos foram relatados. Várias explicações para este fenômeno foram consideradas como: alta taxa de infecção, podendo resultar em poucos casais de vermes sobreviventes, mesmo sendo a droga efetiva; alta transmissão, com rápida reinfecção e larga proporção de infecções imaturas; a falta de adequada resposta imune sinérgica neste foco senegalês e susceptibilidade (ou resistência) da cepa local (Cioli *et al.*, 1995).

Em estudos posteriores foi evidenciado que se aumentando a dose de praziquantel de 40 para 60 mg/kg não se obteve resultados significativos (Guissé *et al.*, 1997), e quando o oxamniquine foi empregado na dose de 20mg/kg, foi evidenciada alta percentagem de cura (Stelma *et al.*, 1997).

O agressivo uso do praziquantel no Egito indica ter também favorecido o desenvolvimento de schistosomas resistentes. Ismail e colaboradores (1999) verificaram um aumento significativo nos valores da dose efetiva 50% de isolados recuperados de pacientes que não responderam à droga, com concentrações até cinco vezes maiores do que a do controle.

Mais recentemente Liang e colaboradores (2001) confirmaram a resistência de *S. mansoni* ao praziquantel em camundongos tratados com 3 x 200 mg/kg, comparando cinco isolados resistentes e cinco isolados susceptíveis do Senegal, Kenya e Egito. Eles observaram que os isolados resistentes foram menos responsivos ao praziquantel (59-74% de redução da carga parasitária) do que os isolados susceptíveis (92-100%).

Apesar das evidências mostrarem a resistência de cepas de schistosoma ao praziquantel, o mecanismo bioquímico como este processo ocorre, ainda não é conhecido (Köhler, 2001).

A eficácia do oxamniquine representa hoje a única alternativa ao praziquantel, mas tal eficácia está condicionada à infecções ocasionadas exclusivamente pelo *S. mansoni*. Este quadro, não apenas justifica, mas aponta a necessidade do imediato planejamento e desenvolvimento de novos agentes esquistossomicidas, conforme denuncia pesquisadores e entidades não-governamentais (Cioli, 2000; TDR, 2002).



# PERSPECTIVAS DE NOVAS DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS

#### 4- PERSPECTIVAS DE NOVAS DROGAS ESQUISTOSSOMICIDAS

A busca de novos compostos esquistossomicidas é hoje uma necessidade imperiosa, justificada por situações como a indisponibilidade de vacina, ocorrência de resistência de cepas de schistosomas ao praziquantel, hoje o único fármaco disponível no mercado, e ainda, a migração de populações das áreas endêmicas favorecendo o surgimento de novos focos de transmissão, inclusive em áreas urbanas.

Em geral, o desenvolvimento de novos agentes terapeuticamente úteis visa três aspectos principais: a) eficácia; b) redução de efeitos colaterais; c) promoção de uma eficiente forma de administração. Para a investigação desses agentes, o método da modificação molecular é o mais utilizado e consiste basicamente em tomar, como protótipo, uma substância de estrutura química definida e de ação biológica conhecida e daí sintetizar e ensaiar novos compostos que lhes sejam análogos (Gringauz, 1997). As variações estruturais conferem novas propriedades físicas e alteram a reatividade de uma molécula, que por sua vez causa mudanças na distribuição nas células e nos tecidos, no acesso aos centros ativos de enzimas e receptores, nas velocidades de reação em tais centros e nos modelos de excreção. Mesmo uma alteração aparentemente pequena na estrutura química pode revelar efeitos biológicos que haviam estado latentes ou eclipsados pelos efeitos colaterais da droga.

Embora a presença de um grupo específico não pressuponha necessariamente que a molécula terá determinada propriedade biológica, visto que esta é função da molécula como um todo, os grupos químicos presentes ou introduzidos numa substância são importantes por dois motivos: a) podem ser essenciais para a manifestação de determinada ação biológica, em razão de sua reatividade química ou da disposição espacial; b) podem modificar a intensidade de determinada ação biológica, em consequência dos efeitos característicos que exercem. Para se obter uma resposta biológica máxima, porém, importa que a reatividade química esteja situada dentro de certos limites. Por um lado, grupos demasiadamente reativos –que reagem facilmente com vários centros celulares–

talvez impeçam que a droga atinja o alvo desejado. Por outro, grupos pouco reativos podem tornar desprezível a atividade biológica do fármaco.

Patrick (1997) cita estratégias de síntese de análogos mais usadas pelos químicos medicinais na busca de novas drogas: a) variação de grupos substituintes; b) extensão da estrutura; c) contração/extensão da cadeia; d) contração/expansão de anéis; e) variações de anéis; f) isósteros; g) simplificação da estrutura; h) rigidificação da estrutura.

No plano internacional, os esforços mais recentes visando a identificação de novas moléculas esquistossomicidas restringem-se ao artemeter, a compostos da série 9-acridanona-hidrazona, a alguns membros da série N-alquil-tio-sulfúrico e a ciclosporina A.

O artemeter, introduzido recentemente e descrito na lista de drogas essenciais da OMS para uso contra a malária (WHO, 1999), apresenta atividade profilática contra *S. japonicum* e *S. mansoni*. O uso do artemeter é recomendado em situações especiais como uma ferramenta adicional nas medidas de controle da esquistossomose. Entretanto, o uso dessa droga, a longo prazo, não é financeiramente possível quando se almeja intervir em populações; também não é aconselhado seu uso nas regiões onde a malária é endêmica, visto a possibilidade de contribuir para o desenvolvimento de *Plasmodium spp* artemeter-resistentes (Utzinger *et al.*, 2000).

Compostos da série 9-acridanona-hidrazona também foram testados em animais de diversas espécies infectados com diferentes cepas de schistosoma (Stohler e Montavon, 1984; Coelho e Pereira, 1991). Bons resultados foram obtidos usando dose oral única contra formas maduras e imaturas, mas nenhum estudo envolvendo humanos tem sido relatado (Cioli, 1998).

A ciclosporina A, um peptídeo de origem fúngica, apresenta efeito imunossupressivo e atividade antiparasitária contra schistosomas, plasmódios, nematodas e cestodas (Bueding *et al.*, 1981; Bell *et al.*, 1996). Todavia, estas propriedades não estão relacionadas entre si, uma vez que análogos da ciclosporina A com baixa atividade imunossupressiva ainda exercem efeitos antiparasitários (Chappell *et al.*, 1987). Khattab e colaboradores (1998) observaram seu efeito sobre a inibição da atividade enzimática da ciclofilina de

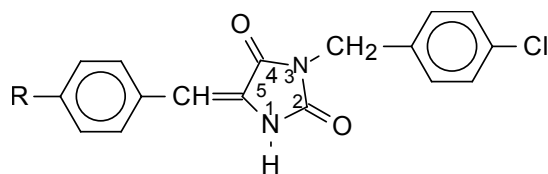
schistosomas, mas não encontraram correlação com a propriedade esquistossomicida.

Além desses trabalhos visando a procura de novos agentes esquistossomicidas, citamos que alguns membros da série do ácido N-alkil-tio-sulfúrico exibiram atividade, especialmente contra vermes fêmeas (Penido *et al.*, 1994).

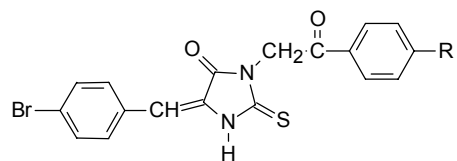
Afora esses esforços, não há registros recentes na literatura de trabalhos envolvendo a síntese de novas drogas ativas contra a esquistosomose, apesar do apelo proclamado pela Organização Mundial de Saúde ao convocar, especialmente neste ano, toda a comunidade científica pertinente na pesquisa de novas drogas esquistossomicidas (TDR, 2002).

No presente trabalho, tendo o niridazol como protótipo, algumas das estratégias de modificação molecular preconizada na literatura foram aplicadas, como a variação de grupos substituintes, mediante a introdução de halogênios e dos grupamentos metil e fenil para a obtenção de derivados benzilideno-imidazolidínicos. Adicionalmente, promoveu-se a extensão da cadeia lateral no nitrogênio situado em posição 3 do anel pentagonal objetivando a geração de novos sítios de ligação com os receptores existentes no *S. mansoni*, direcionando nossas pesquisas na avaliação da susceptibilidade *in vitro* de vermes adultos frente aos derivados obtidos.

Para tal fim, foram avaliados vinte compostos imidazolidínicos assinalados a seguir:

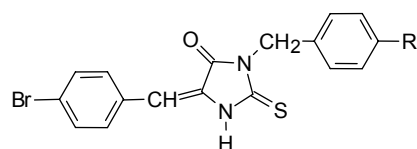


- 5-Benzilideno-3-(4-cloro-benzil)-imidazolidina-2,4-diona **FZ-2B**
- 3-(4-Cloro-benzil)-5-(4-cloro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona **FZ-3A**
- 3-(4-Cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona **FZ-4**
- 5-(4-Bromo-benzilideno)-3-(4-cloro-benzil)-imidazolidina-2,4-diona **FZ-6A**
- 3-(4-Cloro-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona **FZ-7BA**



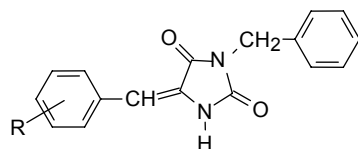
R= Cl ou NO<sub>2</sub>

- 5-(4-Bromo-benzilideno)-3-[2-(4-cloro-fenil)-2-oxo-etil]-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **NN-129**
- 5-(4-Bromo-benzilideno)-3-[2-(4-nitro-fenil)-2-oxo-etil]-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **NN-142**



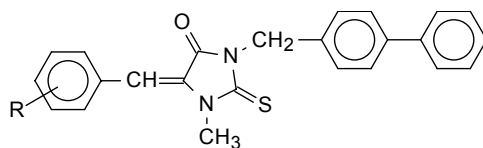
R= Cl ou NO<sub>2</sub>

- 5-(4-Bromo-benzilideno)-3-(4-cloro-benzil)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **NN-140**
- 5-(4-Bromo-benzilideno)-3-(4-nitro-benzil)-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **NN-139**



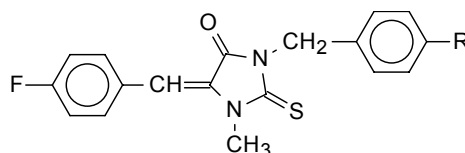
R= H; 4-NO<sub>2</sub> ou 2-F

- 3-Benzil-5-benzilideno-imidazolidina-2,4-diona **NE-1C**
- 3-Benzil-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona **NE-3B**
- 3-Benzil-5-(2-flúor-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona **NE-4**



R= 3-Cl; 3-F; 4-F ou 4-CH<sub>3</sub>

- 5-(3-Cloro-benzilideno)-3-(4-fenil-benzil)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **JT-17**
- 3-(4-Fenil-benzil)-5-(3-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **JT-57**
- 3-(4-Fenil-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **JT-62**
- 3-(4-Fenil-benzil)-5-(4-metil-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **JT-67**



R= H; Cl; Br ou F

- 3-Benzil-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **JT-58**
- 3-(4-Cloro-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **JT-59**
- 3-(4-Bromo-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **JT-60**
- 3-(4-Flúor-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **JT-61**

As metodologias de síntese e as propriedades estruturais para os derivados citados podem ser encontradas em trabalhos desenvolvidos no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos do Instituto de Antibióticos da UFPE: **FZ-4** (Lima *et al.*, 1992); **FZ-6A**, **FZ-3A**, **FZ-2B** (Góes *et al.*, 1991 A); **FZ-7BA** (Costa *et al.*, 1995); **NN-129**, **NN-139**, **NN-140**, **NN-142** (Oliveira 2002); **NE-1C**, **NE-3B** (Góes *et al.*, 1991 B); **NE-4** (Menezes *et al.*, 1992) e **JT-17** (Andrade *et al.*, 2002).

Os resultados do estudo das fragmentações em espectrometria de massas sob impacto eletrônico dos compostos a seguir encontram-se em suas respectivas publicações: **FZ-4**, **FZ-3A**, **FZ-2B** (Galdino *et al.*, 1991 A); **FZ-6A**



(Pitta *et al.*, 1992); **NE-1C**, **NE-3B** (Galdino *et al.*, 1991 B) e **NE-4** (Galdino *et al.*, 1992). Adicionalmente, uma análise cristalográfica para o derivado **NE-4** é relatada em Simone e colaboradores (1996).

A metodologia de preparação dos novos derivados **JT-58**, **JT-59**, **JT-60** e **JT-61**, assim como as propriedades físico-químicas e a análise dos resultados espectroscópicos para comprovação estrutural podem ser encontrada em Albuquerque e colaboradores (2002).

Do ponto de vista configuracional, os compostos utilizados na avaliação esquistosomicida apresentaram-se isomericamente puros. Cálculos de modelagem molecular através do método Hartree-Fock (HF), tanto a nível semi-empírico AM1 (Dewar e Thiel, 1977), quanto *ab initio* (Levine, 1991) a partir do conjunto de bases 3-21G\*\* (Dobbs e Hehre, 1987), através do programa Gaussian 94 mostraram, pela variação de energia no calor de formação em derivados benzilideno imidazolidínicos, que a configuração Z é prevista como sendo a mais estável (Oliveira, 2002). Estudos cristalográficos realizados para o derivado 3-benzil-5-(2-flúor-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona **NE-4** confirmaram esta configuração (Simone, 1996).

Os compostos **JT-57**, **JT-62** e **JT-67** apresentados neste trabalho ainda não foram divulgados em periódicos especializados. Nos Anexos 1 e 2 encontram-se o protocolo experimental e os resultados das análises espectroscópicas confirmando as estruturas das novas moléculas. O diagrama de síntese utilizado encontra-se na Figura 4.

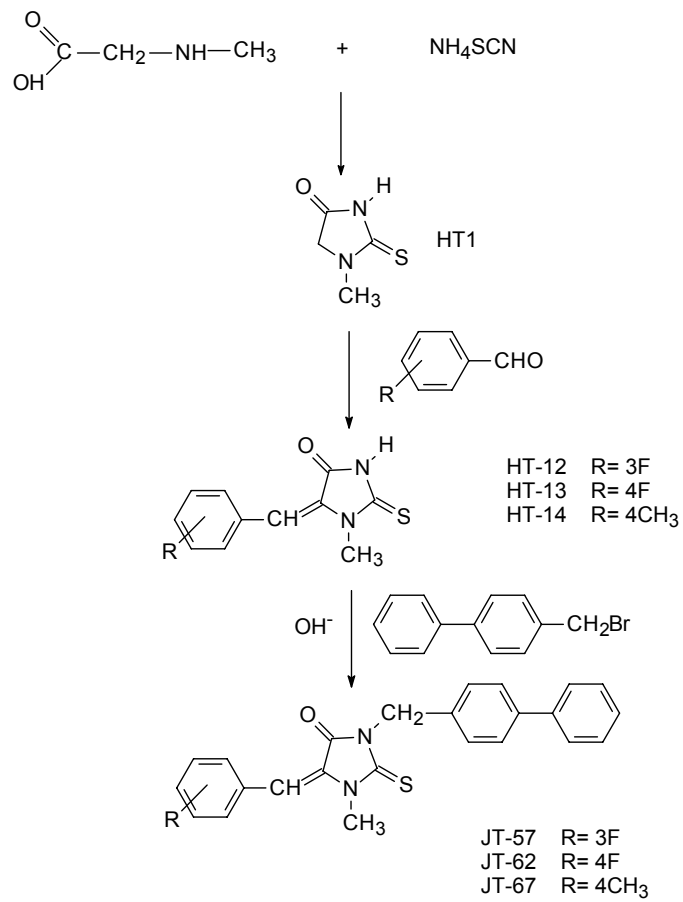


Figura 04: Diagrama de síntese dos derivados JT-57, JT-62 e JT-67



# CAPÍTULO 1

Synthesis and schistosomicidal activity of benzylidene imidazolidine  
compounds

Submetido a IL FARMACO  
Elsevier Itália

## Synthesis and schistosomicidal activity of benzylidene imidazolidine compounds

M.C.P.A.Albuquerque<sup>1,2</sup>, M.G.R.Pitta<sup>1</sup>, P.G.Silva<sup>1</sup>, E.Malagueño<sup>1</sup>, J.V.Santana<sup>1</sup>, J.I.Irmão<sup>2</sup>, M.C.A.Lima<sup>3</sup>, S.L.Galdino<sup>3</sup>, I.R.Pitta<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA

<sup>2</sup>Departamento de Medicina Tropical - UFPE

<sup>3</sup> Departamento de Antibióticos - Universidade Federal de Pernambuco  
50670-901- Recife - PE – Brasil E-mail <irpitta@aol.com>

### Abstract

Synthesis and physico-chemical properties of new 3-benzyl-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-ones have been described. These benzylidene imidazolidines compounds are prepared by Knoevenagel condensation with the benzaldehydes. The schistosomicidal activity of these compounds was evaluated. The most active compound of the series was 3-(4-chloro-benzyl)-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one.

**Keywords: Imidazolidines, Antischistosomal activity**

### Introduction

Niridazole, chemically 1-(5-nitro-2-thiazolyl)-2-imidazolidinone, was employed for the treatment of schistosomiasis infections, its efficacy is good but presents serious drawbacks, the trans-5-amino-3-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-1,2,4-oxadiazole, a molecule bearing some structural similarity to niridazole, demonstrated antischistosomal activity [1]. This work describes the synthesis and the physicochemical properties of 3-benzyl-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-ones resulting of the Knoevenagel condensation with various benzaldehydes and alkylation with benzyl chlorides. The synthesized imidazolidine compounds structurally related of niridazole were evaluated against their potential schistosomicidal activity.

### Chemistry

The 3-benzyl-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-ones JT58-61 were synthesized in three stages. Initially 1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one was prepared using 1-methyl-glycine and thiocyanate of ammonium [2]. Then, the 1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one reacts with 4-fluoro-benzaldehyde in the DMF in the presence of sodium methoxyde to form 5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one. The alkylation of this compound in position 3 was led in the presence of potassium hydroxide and benzyl halides in alcoholic milieu. The 3-benzyl-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo- -imidazolidin-4-ones are thus obtained (Scheme 1).

The benzylidene imidazolidinones presented in this work were isolated in the form of only one isomer. The study by coupled spectrometry of NMR  $^{13}\text{C}$ -H, determining the value of the constant of coupling between the ethylene proton and the carbon of exocycle carbonyl in position 4, carried out for others derived 3-benzyl-5-benzylidene-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-ones showed that the compounds resulting from standard Knoevenagel condensation in alkaline milieu present a configuration Z [3]. The molecular mechanics study using the Hyperchem and Mopac programs for 3-benzyl-5-benzylidene-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-ones compounds confirmed equally that isomer Z is also, from the thermodynamic point of view, most stable [3].

The synthesis and the physicochemical characteristics of 1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one compound are described in the literature [4]. The physicochemical and spectroscopic characteristics in IR, NMR $^1\text{H}$  and MS of the benzylidene imidazolidinones prepared are described in the experimental part. Fragmentations observed and the intensity of the peaks of the isotopes in electronic impact in MS are in agreement with the structures.

### Experimental

The melting points were measured on a Buchi apparatus with oil bath, in capillary tubes. The R<sub>f</sub> in thin layer chromatography were measured on the silica gel plates Merck 60 F<sub>254</sub>, with 0,2 mm of thickness. The infrared spectra were recorded on an apparatus Perkin-Elmer 1310, in pastille of KBr to the concentration of 1%, the wavelengths are expressed in  $\text{cm}^{-1}$ . Nuclear magnetic resonance spectra were recorded on an AC 200 FT (Bruker) spectrometer  $^1\text{H}$  NMR at 200 MHz, the chemical shifts ( $\delta$ ) are expressed in parts per million (ppm) and the coupling constants (J) in Hertz (Hz). The mass spectrometry, by electronic impact 70eV, were recorded on an apparatus HP G1019A, coupled has a CPG (HP5890). The intensity of the molecular peaks is given compared to the most intense peak  $\text{M}^+$ (%). The fragmentations observed were in agreement with the structures suggested.

#### 5-(4-Fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one

A mixture of 1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one (1.3g 10mmol), 4-fluoro-benzaldehyde (1.86g, 15mmol) and sodium acetate (2,5g) in 10mL of acetic acid is refluxed for 3h. After cooling, the precipitated product is washed with water and acetic acid.  $\text{C}_{11}\text{H}_9\text{FN}_2\text{OS}$  Rdt 57%. M.p. 222-224°C. R<sub>f</sub> ( $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$  96:4) 0.7. IR  $\text{cm}^{-1}$  (KBr):  $\nu$  3100, 1730, 1630, 1490, 1160, 840  $\text{cm}^{-1}$ . RMN $^1\text{H}$  ( $\delta$  ppm DMSO  $d_6$ ): 3.45 (s, 3H NCH<sub>3</sub>), 6.74 (s, CH ethylene), 7.56 (t, 2H benzylidene, J=8,9Hz), 8.13 (dd, 2H benzylidene, J=5.7Hz); 12.37 (s, 1H NH).

#### 3-Benzyl-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-ones

A solution of hydroxide sodium de (0.12 g, 2.2mmol) in methanol (3mL) is added dropwise to a stirred suspension of 5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one (0.47g, 2mmol) in methanol (2mL). After 10 min of contact, the benzyl halide (2.5mmol) is added and left at the ambient temperature for 24h. After cooling, the precipitate was filtered and washed with water and diethyl ether. The benzylidene imidazolidinones produced by this reaction, presented a degree of purity sufficient for the essays.

3-Benzyl-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one **JT58**  
C<sub>18</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>2</sub>OS, Rdt 50%. M.p. 220-222°C. TLC, (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH 99:1) R<sub>f</sub> 0,91. IR cm<sup>-1</sup> (KBr):  $\nu$  1674, 1610, 1595, 1458, 1389, 1153, 831 cm<sup>-1</sup>. NMR<sup>1</sup>H ( $\delta$  ppm DMSO d<sub>6</sub>): 3.3 (s, 3H NCH<sub>3</sub>), 4.57 (s, 2H CH<sub>2</sub>), 6.83 (s, CH ethylene), 7.31-7.49 (m, 5H benzyl), 7.25 (t, 2H benzylidene, J=8.8Hz), 8.33 (dd, 2H benzylidene). MS m/z(%): 326(M+ 71,4), 293(100), 235(22,7), 148(23,9), 134(33,3).

3-(4-Chloro-benzyl)-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one **JT59**  
C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>ClFN<sub>2</sub>OS Rdt 33%. M.p. 218-220°C. TLC, (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH 98:2) R<sub>f</sub> 0,91. IR cm<sup>-1</sup> (KBr):  $\nu$  1684, 1594, 1453, 1373, 1152, 826 cm<sup>-1</sup>. NMR<sup>1</sup>H ( $\delta$  ppm DMSO d<sub>6</sub>): 3.29 (s, 3H NCH<sub>3</sub>), 4.57 (s, 2H CH<sub>2</sub>), 6.84 (s, CH ethylene), 7.25 (t, 2H benzylidene, J=8.9Hz), 7.4 (d, 2H benzyl, J=8.4Hz), 7.5 (d, 2H benzyl, J=8.4Hz), 8.33 (dd, 2H benzylidene). MS m/z(%): 360(M+ 100), 327(92.7), 292(41.8), 235(64), 148(40.5), 134(50.2).

3(4-Bromo-benzyl)-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one **JT60**  
C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>BrFN<sub>2</sub>OS Rdt 69%. M.p. 215-217°C. TLC, (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH 98:2) R<sub>f</sub> 0,76. IR cm<sup>-1</sup> (KBr):  $\nu$  1689, 1612, 1595, 1453, 1374, 1158, 837 cm<sup>-1</sup>. NMR<sup>1</sup>H ( $\delta$  ppm DMSO d<sub>6</sub>): 3.29 (s, 3H NCH<sub>3</sub>), 4.55 (s, 2H CH<sub>2</sub>), 6.83 (s, CH ethylene), 7.25 (t, 2H benzylidene, J=8.8Hz), 7.43 (d, 2H benzyl, J=8.3Hz), 7.54 (d, 2H benzyl, J=8.2Hz), 8.33 (dd, 2H benzylidene). MS m/z(%): 404(M+ 100), 406(100), 373(65.7), 371(59), 292(74.3), 235(58.5), 148(36.3), 134(35.1).

3-(4-Fluoro-benzyl)-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one **JT61**  
C<sub>18</sub>H<sub>14</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>OS Rdt 54%. M.p. 220-222°C. TLC, (CHCl<sub>3</sub>:CH<sub>3</sub>OH 98:2) R<sub>f</sub> 0,85. IR cm<sup>-1</sup> (KBr):  $\nu$  1674, 1616, 1600, 1510, 1463, 1242, 1160, 837 cm<sup>-1</sup>. NMR<sup>1</sup>H ( $\delta$  ppm DMSO d<sub>6</sub>): 3.29 (s, 3H NCH<sub>3</sub>), 4.57 (s, 2H CH<sub>2</sub>), 6.84 (s, CH ethylene), 7.17 (t, 2H benzyl, J=8.8Hz), 7.25 (t, 2H benzylidene, J=8.8Hz), 7.54 (dd, 2H benzyl), 8.33 (dd, 2H benzylidene). MS m/z(%): 344(M+ 100), 311(66.5), 235(25.1), 148(25.8), 134(26.2).

### Biological activity

The BH (BH - Belo Horizonte, MG, Brazil) strain of *Schistosoma mansoni* was routinely maintained at LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami) by standard passage through *Biomphalaria glabrata* snails provided by the Department of Tropical Medicine (University Federal of Pernambuco). Adult schistosomes, obtained by perfusion using dissecting needles, were recovered from the mesenteric and portal veins of untreated Swiss albino mice, weighing 18-22g, infected 8-12 weeks earlier [5]. There are models available which can be used to study adult worms susceptibility of *S. mansoni* to drugs in vitro [6]. Male and female were examined in the experiments. The worms were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma) buffered to pH 7.5, supplemented with HEPES (20mM), 10% foetal bovine serum (Cultilab), penicillin (100U/mL), and streptomycin (100mg/mL). Incubation was carried out at 37°C in a humid

atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The effect of 3-benzyl-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-ones compounds **JT58-61** on the viability of the *S. mansoni* was examined by incorporating the drugs into the medium employed for parasite culture. The drugs, at appropriate concentrations, were dissolved in DMSO (1.5% v/v). This solvent concentration did not affect worms mortality, pairing, or motility. In all experiments two adult worms, unpaired were placed in multi-well plastic tissue culture dishes containing 3mL of medium. A minimum of 30 worms was used in each treated and control groups. Worms viability was observed under a inverted microscope (60X) until 15 days after drugs addition. Worms just treated with DMSO were included as control in every experiment. Praziquantel was chosen as standard control. Parasites were considered dead when no movement could be detected over a 3-min period. Strict aseptic techniques were used throughout the experiments.

## Results

The viability in vitro of adult worms was observed during incubation with 120 or 180µg/mL of 2-thioxo-imidazolidin-4-ones derivatives. The Figure 1 shows that from the 7th day was not observed the mortality of the worms, male and female, at 120µg/mL of **JT58**. In the 11th day of assay all the worms, in both doses, had revealed sensible to this compound. To the end of 15 days it was gotten maximum reply for the female worms. Also it was observed a relation time- and dose-dependent response.

The compound para-chloro-benzyl **JT59** was the most active of the series (Figure 2). From the 3th day of contact with this compound the female worms, in the dose of 180µg/mL, showed sensibility, and at the end of the period of the assay no parasites survived. The maximum response was reached in the 7th day with the female worms incubated with 180µg/mL. This compound also presented a relation time- and dose-dependent response.

The results obtained with para-bromine-benzyl compound **JT60** are atypical for the relation dose-response. However, at the end of 15th day, the females were more sensible than the males, in both doses. The compound **JT61**, where the fluorine atom is present in the para position of two aromatic rings, from 8th day, on the male worms had revealed sensibility in the dose of 180µg/mL, and female worms in both doses. With this compound the maximum response was not reached, but the females shown more sensibility than the males.

The action of praziquantel, 2-cyclohexylcarbonyl-1,2,3,6,7,11b-hexahydro-4H-pyrazino[2,1-a]-isoquinolin-4-one, in the dose of 60µg/mL showed that female and male were sensible in the first day, and at the end of 15th day no parasite survived.

Figure 1- Survival of schistosomes maintained in vitro for 15 days in the presence of 2-thioxo-imidazolidin-4-ones compounds at 120 and 180µg/mL.

Figure 2- Survival of male and female schistosomes maintained in vitro for 15 days in presence of 2-thioxo-imidazolidin-4-ones compounds at 180µg/mL.

In relation to the movements, the motility of the worms was considerably reduced after 24 hours of contact with the drugs. Through microscopic observation,



alterations on the worms' tegument had been observed. With **JT58**, in the dose of 120µg/mL, the male worms presented bending and shortened body, suggesting contraction of the longitudinal muscles. With the **JT59** compound, females had presented many bubbles when the dose of 180µg/mL was used. **JT61** caused degeneration in the internal structure of the worms, losing the transparency. It is necessary to point out that those surviving worms, at the end of the period of assay, presented irreparable alterations on the tegument and discrete movements. Control groups were not affected for up to 15 days of observation and all worms remained paired throughout the observation period and exhibited vigorous activity.

## Conclusion

The presented results demonstrate that **JT59**, in the dose of 180µg/mL, is the most active of the series, reaching the maximum at 9th day of contact with the worms. Except **JT60**, a dose-dependent in the studied derivatives is observed. To the end of the experiments the worms of the groups control had remained viable. A great difference in the biological reply is observed among four composites of the series due to the different substitutes in the benzyl ring. The impossibility of determining a relation dose-response in the **JT60** are, perhaps, due to presence of the voluminous bromine atom. The mechanism through which the antiparasitic effect is mediated still remains unknown. The potency of these derivatives might be taken as a starting basis for the development of new antischistosomal compounds.

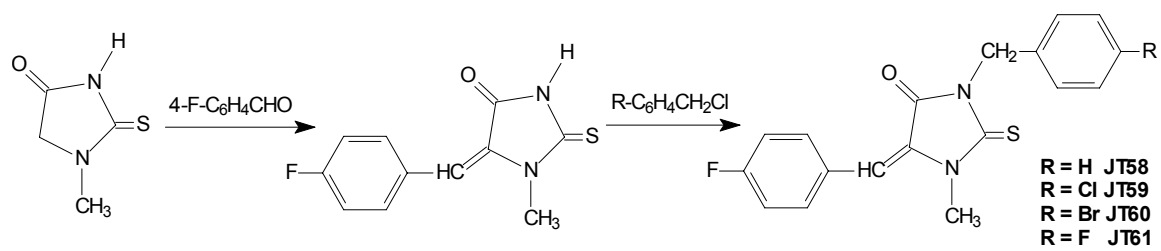
## Acknowledgments

The authors thank the CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasil) for their support.

## References

- [1] C.H. Robinson, E. Bueding, J. Fisher  
Relationship between structure, conformation, and antischistosomal activity of nitroheterocyclic compounds. *Mol. Pharmacol.* 6, (1970) 604-616.
- [2] G.L. Romley, A.L. Greenleaf, G.L. Kenyon  
On the specificity of creatinine kinase. New glicociamines and glycociamine analogs related to creatine. *J. Amer. Chem. Soc.* 20, (1971) 5542-5551.
- [3] S.S.F. Brandão, V.L. Guarda, J. Chantegrel, M. Perrissin, S.L. Galdino, F. Thomasson, V.M. Souza, M.C.A. Lima, L.F.C.C. Leite, I.R. Pitta, C. Luu-Duc  
Synthèse et étude structurale des arylidèneimidazolidines et arylidènebenzothiazines. *Boll. Chim. Farmac.* 139(2), (2000) 54-58.
- [4] T.G. Silva, F.S.V. Barbosa, S.S.F. Brandão, M.C.A. Lima, S.L. Galdino, I.R. Pitta, J. Barbe  
Synthesis and structural elucidation of new benzylidene imidazolidines and acridinylidene thiazolidines. *Heterocyclic Communications*, 7, (2001) 523-528.
- [5] R.H. Duvall, W.B. Dewitt  
An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 16, (1967) 483-486.
- [6] J.G. Mercer, L.M. Chapell

*Schistosoma mansoni*: effect of maintenance in vitro on the physiology and biochemistry of adult worms. *Parasitology* 90, (1985) 339-349.



**Scheme 1.** Synthesis of benzylidene imidazolidine compounds

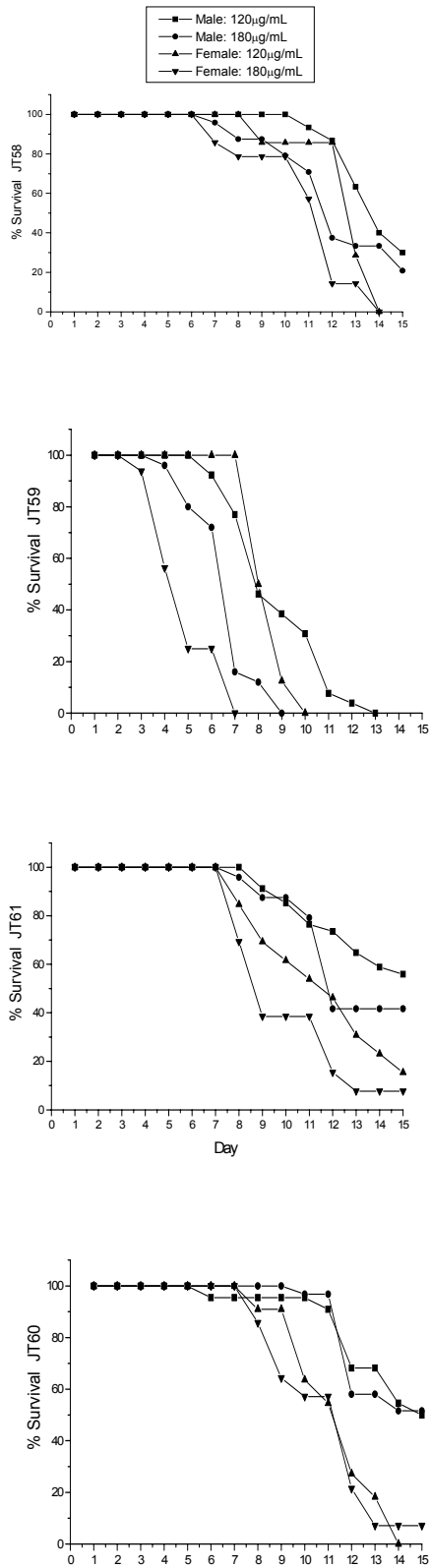


Figure 1- Survival of schistosomes maintained *in vitro* for 15 days in the presence of benzylidene imidazolidine compounds at 120 and 180 µg/mL.

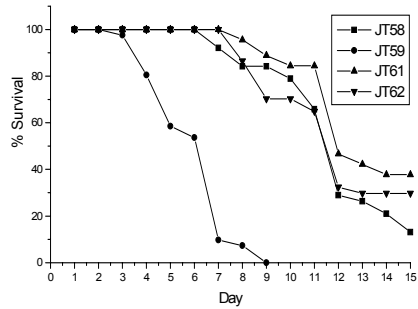


Figure 2- Survival of male more female schistosomes maintained *in vitro* for 15 days in presence of benzylidene imidazolidine compounds at 180µg/mL.



## CAPÍTULO 2

Susceptibility *in vitro* of *Schistosoma mansoni* to imidazolidinone derivatives

Publicado nos Anais do VI Pharmatech  
Recife, 5-8/8/2001

# SUSCEPTIBILITY *IN VITRO* OF *SCHISTOSOMA MANSONI* TO IMIDAZOLIDINONE DERIVATIVES

M.C.P.A. Albuquerque<sup>1</sup>, I.J. Oliveira<sup>2</sup>, A.F. Barbosa<sup>2</sup>, M.G.R. Pitta<sup>2</sup>, J.V. Santana<sup>3</sup>, E. Malagueño<sup>2</sup>, J.I. Irmão<sup>1</sup>, M.C.A. Lima<sup>4</sup>, I.R. Pitta<sup>4</sup>, S.L. Galdino<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Tropical. <sup>2</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas.

<sup>3</sup>Departamento de Biofísica e Radiobiologia. <sup>4</sup>Departamento de Antibióticos.

Universidade Federal de Pernambuco. Av. Prof. Moraes Rego S/N. Cidade Universitária. Recife. CEP: 50.670-901. Brazil

## Introduction

Schistosomiasis is considered the most important of the human helminthiasis in terms of morbidity and infection. It was reported by WHO that (World Health Organization) 200 million people are infected, a further 600 million people are at risk situations in endemic regions and an estimate of 200.000 deaths occurs annually. Anthelmintics are used for the treatment and control of the human schistosomiasis, considering that no vaccines are yet commercially. Resistance to medical anthelmintics has occurred in schistosomes and can be expected to increase concomitantly with continued use of chemotherapeutic agents [1].

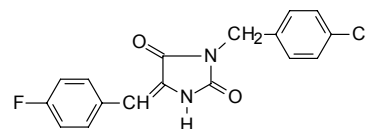
The drug discovery and development process takes a long time and is expansive. To design a drug totally from scratch is theoretically possible, but it is complex and usually unnecessary. The lead compounds can often be modified and provide starting points for the synthesis of analogues. Niridazole, chemically 1-(5-nitro-2-thiazolyl)-2-imidazolidinone, was employed in the second decade of XX century for the treatment of schistosomiasis infections. Its efficacy is good but it presents serious drawbacks, such as the need for multiple oral doses and the occurrence of side effects. For this reason, it is recommended to synthesize chemical analogues with potential antischistosomal activity [2].

Since chemotherapy is used to control schistosomiasis and because drug resistance has appeared in field isolates and in laboratory strains of schistosomes, this work emphasizes research on imidazolidinone derivatives to potential antischistosomal compounds.

## Experimental methods

### • Materials

The synthesis and physicochemical properties of 3-(4-chloro-benzyl)-5-(4-fluoro-benzylidene)-imidazolidine-2,4-dione (FZ-7) has been described [3]. This compound was synthesized by aldolisation-crotonisation reaction from 4-fluoro-benzaldehyde and 3-(4-chloro-benzyl)-



imidazolidine-2,4-dione in the Laboratory of Design and Synthesis of Drugs, Departamento de Antibióticos (Figure 1).

Figure 1 3-(4-chloro-benzyl)-5-(4-fluoro-benzylidene)-imidazolidine-2,4-dione (FZ-7)

### • Determinations of *in vitro* activity of FZ-7

*In vitro* models are available which can be used to study the susceptibility of schistosomes isolates to drugs [4]. The BH (BH - Belo Horizonte, MG, Brazil) strain of *S. mansoni* was routinely maintained in our laboratory by standard passage through *Biomphalaria glabrata*. Adult male and schistosomes, obtained by perfusion of untreated mice infected 8-12 weeks earlier [5] were maintained suspended *in vitro* in RPMI-1640 medium supplemented with HEPES, foetal bovine serum, Penicillin, and Streptomycin. Incubation was carried out at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. The effect of FZ-7 on the viability of the *S. mansoni* was examined by incorporating the drug into the medium employed for parasite culture.

The drug at appropriate concentrations (80 and 120 µg/ml) was dissolved in DMSO (1.5% v/v). This solvent concentration did not affect worms mortality, pairing, and motility. In all experiments two adult worm, paired or unpaired were placed



in multi-well plastic tissue culture dishes. A minimum of 18 worms was used in each treatment group. Motility, pairing, and mortality was observed under inverted microscope at 15 days after FZ-7 addition. Control worms were treated with DMSO and were included in every experiment. Parasites were considered dead when no movement could be detected over a 3-min period.

## Results and discussion

At 80µg/ml, FZ-7 had little effect on parasite mortality and pairing, but produced marked decreases in worm motility within the first 24 hours. The Figure 2 shows that at 120µg/ml was observed reductions in schistosome pairing. FZ-7, as well Niridazole, showed a lethal action more important on female worms than on male *S. mansoni* [6].

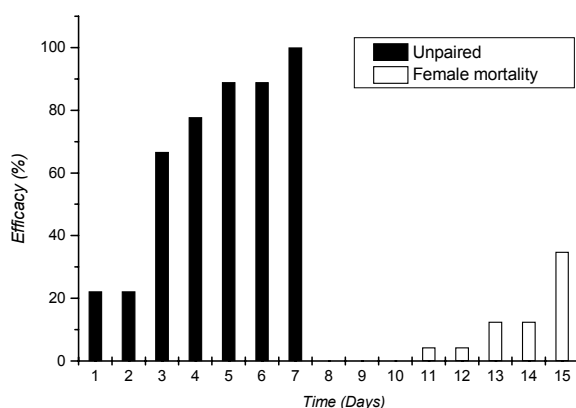


Figure 2 The efficacy of FZ-7 at 120µg/ml against female mortality (white) and unpaired (black) of *S. mansoni* maintained *in vitro* for 15 days

The experiments show that the exposure to the FZ-7 resulted in the death of 35% female and this lethal effect was dependent on drug concentration and time incubation. The degree of cell damage caused by FZ-7 treatment was more severe than the effect observed in worms without drug. It was

observed ballooning of the tegument on treated group.

## Conclusion

Our results indicate that this compound is deleterious to *S. mansoni* maintained *in vitro*.

## Acknowledgements

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) - PIBIC - FACEPE / UFPE.

## References

- [1] L. Chitsulo, D. Engels, A. Montresor and L. Savioli  
The global status of schistosomiasis and its control  
*Acta Trop.*, **77** 41-51 (2000)
- [2] D. Cioli  
Chemotherapy of schistosomiasis: an update  
*Parasitology Today*, **14** 418-422 (1998)
- [3] D.L.B. Costa, J. Chantegrel, M.C.A. Lima, J.F.C. Albuquerque, R.M.O.C. Lima, S.G. Galdino, I.R. Pitta and C. Luu-Duc  
Imidazolidinediones et thiazolidinediones substituées: synthèse, étude structurale et activité cytotoxique  
*J.Pharm.Belg.*, **50** 5-10 (1995)
- [4] J.G. Mercer and L.M. Chapell  
*Schistosoma mansoni*: effect of maintenance *in vitro* on the physiology and biochemistry of adult worms  
*Parasitology*, **90** 339-349 (1985)
- [5] R.H. Duvall and W.B. Dewitt  
An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals  
*Am.J.Trop.Med.Hyg.*, **16** 483-486 (1967)
- [6] F. Benazet and J.-P. Leroy  
Activité de la (nitro-5-thiazolyl-2)-1-imidazoline thione-2 (26354 R.P.) sur la bilharziose expérimentale des animaux de laboratoire  
*Bull.Soc.Pathol.Exot.*, **3** 287-297 (1974)



## CAPÍTULO 3

**A resposta do *Schistosoma mansoni* mantido *in vitro* frente a derivados  
imidazolidinônicos**

Tópicos especiais do livro Química Medicinal: Novas Estratégias  
em Planejamento Racional de Fármacos  
Editado por Carlos Montanari

**A RESPOSTA DO *SCHISTOSOMA MANSONI* MANTIDO  
IN VITRO FRENTE A DERIVADOS  
IMIDAZOLIDINÔNICOS**

<sup>1</sup>Oliveira, S.M., <sup>2</sup>Albuquerque, M.C.P.A., <sup>3</sup>Pitta, M.G.R., <sup>3,4</sup>Malagueño, E.,  
<sup>3,5</sup>Santana, J.V., <sup>1</sup>Lima, M.C.A., <sup>1</sup>Pitta, I.R., <sup>1</sup>Galdino, S.L.

<sup>1</sup>Departamento de Antibióticos, <sup>2</sup>Departamento de Medicina Tropical, <sup>3</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, <sup>4</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, <sup>5</sup>Departamento de Biofísica. Universidade Federal de Pernambuco. 50670-901. Recife, PE. E-mail: suelygaldino@aol.com

**Abstract**

Tropical diseases affect hundreds of millions of people, most of them are poor. They impede social and economic development in the poorest countries, and cause great suffering to those affected. Tools (e.g. drugs, vaccines, diagnostics) and strategies to control tropical diseases often fail, due to difficulties in implementation or development of drug resistance, for example. Research is needed to generate new knowledge, and to develop new and improved tools, methods and strategies for the disease control. In the search for compounds with schistosomicidal activity, the present work describes chemotherapeutic investigations on (Z)3-benzyl-5-benzylidene-imidazolidine-2,4-dione or (Z) 3-benzyl- or 3-(2-oxo-2-phenyl-ethyl)- 5-benzylidene-2-thioxo-imidazolidin-4-one derivatives with different substituents in position *para* of the phenyl rings. This study clearly showed that 3-(4-cloro-benzyl)-5-(4-nitro-benzylidene)-imidazolidine-2,4-dione FZ-4, a nitro derivative on benzylidene, was more active than chloro, bromo and unsubstituted compounds in producing mortality of *Schistosoma mansoni* adult worms maintained *in vitro*.

Palavras chave: Imidazolidinonas, *Schistosoma mansoni*, Susceptibilidade *in vitro*.

**Introdução**

A esquistossomose é uma infecção parasitária causada por espécies de vermes trematódeos, cujo hospedeiro definitivo é o homem. A doença acomete cerca de 200 milhões de pessoas das regiões tropicais e subtropicais da Terra. Sua distribuição é determinada pela espécie, as quais provocam diferentes formas clínicas da doença. A esquistossomose intestinal, causada pelo *S. mansoni*, é endêmica em várias partes da África, América do Sul e Mediterrâneo oriental. Os vermes adultos, os quais não se

multiplicam no corpo humano, desenvolvem-se nas veias porto-hepáticas, e acasalados os seguem para as veias mesentéricas local onde fazem a oviposição. As seqüelas da doença são causadas predominantemente pelos ovos, muitos dos quais são excretados nas fezes, mas uma boa quantidade são arrastados até o fígado ou ficam no intestino grosso, induzindo a formação de granulomas e reações fibróticas. A infecção severa crônica pode resultar em hipertensão portal caracterizada por hepato-esplenomegalia, varizes esofágicas e ascite. Pela inexistência de vacinas e de ações eficazes em saúde pública, as drogas são as principais ferramentas no controle da esquistossomose.

A quimioterapia “moderna” contra esquistossomose iniciou-se em 1918, quando acidentalmente, constatou-se o primeiro tratamento com êxito da doença utilizando tartarato de antimônio e potássio (Christopherson, 1918). Esta droga foi usada até a Segunda Guerra Mundial, época em que o lucantone foi introduzido na clínica. Um período de intenso progresso ocorreu na década de 1960 com a introdução da emetina, niridazol, hicanone, oxamniquine e metrifonato. Este período culminou em 1977 com a síntese do praziquantel, atualmente droga de escolha no tratamento da esquistossomose. Apesar do importante passo dado há mais de duas décadas no tratamento clínico da esquistossomose, na ocasião da introdução na terapêutica do praziquantel, ainda hoje no mundo, das 200 milhões de pessoas infectadas, 120 milhões são sintomáticas e 20 milhões desenvolvem a forma grave da doença, ressaltando as 600 milhões que se encontram em situação de risco (Capron, 1998). Além do praziquantel, a outra alternativa disponível na quimioterapia da esquistossomose e recomendada pela WHO é o oxamniquine (WHO, 1999). Pela comprovada eficácia do praziquantel, como conseqüência da sua utilização indiscriminada e praticamente exclusiva na maioria das áreas endêmicas, dois potenciais perigos têm surgido: Primeiro, a possibilidade de que pesquisas envolvendo novas drogas sejam interrompidas ou nem mesmo iniciadas, provocando inclusive o desinteresse de centros de pesquisas e das companhias farmacêuticas em desenvolverem novos medicamentos. O segundo, após o pioneiro relato de resistência a uma droga esquistossomicida apresentado por Rogers e Bueding em 1971, a possibilidade de ocorrer a emergência de cepas de *Schistosoma* praziquantel- e oxamniquine-resistentes (Danso-Appiah, De Vlas, 2002; Cioli, 2000; Coles *et al.*, 2001; Grover *et al.*, 2001; Morgan *et al.*, 2001).

A quimioterapia representa hoje o único recurso imediato para minimizar a prevalência e a incidência da esquistossomose no mundo (Cioli *et al.*, 1995). Em busca de novos

agentes ativos na esquistossomose, o niridazol, apresenta-se como protótipo pela presença do anel imidazolidinônico, o qual confere, além da atividade anti-helmíntica, outras propriedades biológicas. A atividade esquistossomicida demonstrada pelas imidazolidinonas e de análogos estruturais norteiam as investigações na busca de novas drogas que apresentem maior seletividade pelos alvos celulares do *S. mansoni*. A preparação e avaliação da atividade esquistossomicida de novos heterociclos pentagonais imidazolidinônicos certamente contribuirá no desenvolvimento de novas drogas contra esse parasito humano.

## **Métodos**

### **Drogas**

Os compostos imidazolidinônicos estudados foram sintetizados no Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da UFPE mediante a utilização de duas diferentes vias de síntese. Os derivados da série imidazolidina-2,4-diona, **FZ-2B**, **FZ-3A** e **FZ-4**, foram preparados pela alquilação do anel imidazolidínico utilizando-se o 4-cloro-benzil-cloreto, seguido da condensação tipo Knoevenagel com benzaldeídos clorado e nitrado (Goes *et al.*, 1991). As tioxo-imidazolidinonas **NN-129**, **NN-139**, **NN-140** e **NN-142** foram obtidas através de uma reação de adição nucleofílica tipo Michael, utilizando-se ésteres 2-ciano-3-fenil-acrilatos de etila, seguido da alquilação com os cloro-metil-benzeno ou os 2-cloro-1-fenil-etanonas correspondentes (Tabela 1). Teoricamente as imidazolidinonas em estudo podem existir sob duas formas diastereoisoméricas, porém as moléculas isoladas apresentaram-se isomericamente puras. Adicionalmente, a configuração *Z* foi comprovada através de estudos cristalográficos realizados com análogos estruturais (De Simone *et al.*, 1995; 1996).

### **Susceptibilidade *in vivo* do *S. mansoni* frente à 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (FZ4)**

Nos ensaios *in vivo* para avaliação da atividade esquistossomicida de drogas utiliza-se camundongos infectados com *S. mansoni* (cepa BH-Belo Horizonte, Brasil) e verifica-se a alteração do oograma, estudo que avalia o desenvolvimento dos ovos de *S. mansoni* encontrados na parede intestinal distal do hospedeiro, sob a ação dessas drogas. A susceptibilidade do *S. mansoni* é então avaliada pela presença de animais com alteração de oograma: é considerado alterado quando estiverem ausentes um ou mais dos estádios

correspondentes a ovos imaturos (Pellegrino e Faria, 1965; Katz *et al.* 1966; Katz e Pellegrino, 1973; Coelho e Pereira, 1991).

#### **Susceptibilidade *in vitro* do *S. mansoni* frente a derivados imidazolidinônicos**

A susceptibilidade de vermes adultos de *S. mansoni*, mantidos *in vitro* em meio de cultura RPMI 1640 enriquecido, frente à drogas é avaliada quanto a sua atividade motora, alterações no tegumento e taxa de mortalidade (Badr *et al.*, 1999; Barth *et al.*, 1996). Após remoção dos vermes adultos de camundongos, os mesmos são lavados no meio e, em seguida, em duplas, são transferidos para placas estéreis de 35mm de diâmetro contendo 2mL de meio e incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após um período de 2 horas de adaptação, adicionam-se as drogas em concentrações variadas. São realizadas triplicatas para cada concentração utilizada. Os parasitos são mantidos durante 15 dias sendo monitorados a cada 24 horas para avaliação do seu estado geral.

#### **Resultados e Discussão**

Na avaliação da susceptibilidade *in vivo* do *S. mansoni* frente à 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (FZ-4) foram utilizadas concentrações de 50mg/kg, administrada em dose única, pelas vias oral (VO) e intraperitoneal (IP), e de 10mg/kg de peso corporal, administrada cinco vezes a cada 24 horas, pelas mesmas vias. Os resultados obtidos, expressos em percentagem de ovos inviáveis contidos em 1g de fragmento intestinal de camundongos fêmeas, após 15 dias de tratamento com FZ4, encontram-se na Tabela 2.

Os resultados relativos à viabilidade de ovos de *S. mansoni* analisados em fragmento da porção distal do intestino grosso de camundongos fêmeas demonstraram, nos grupos controles, que a percentagem de ovos viáveis foi maior do que a de ovos inviáveis, indicando uma predominância das formas imaturas e maduras viáveis e, portanto, capazes de manter a evolução parasitária. Quando submetidos ao tratamento com FZ-4 os resultados mostraram-se inversos. A inviabilidade dos ovos, somada a ausência de uma das fases evolutivas dos estádios imaturos viáveis, demonstrou o efeito biológico do composto testado. O grupo tratado por via IP, em cinco doses consecutivas de 10mg/Kg, teve um acréscimo de 69% de ovos inviáveis. Quando a mesma via foi empregada com a dose única de 50mg/Kg, observou-se um aumento de apenas de 4%, quando comparado ao controle. O tratamento por VO apresentou um aumento de

inviabilidade de 56 e de 30%, respectivamente para as dose de 5x10 e de 50mg/Kg. O esquema terapêutico em 5 doses diárias de 10mg/Kg evidenciou ser mais efetivo em inviabilizar os ovos de *S. mansoni*.

A susceptibilidade do *S. mansoni* mantidos *in vitro* frente a derivados imidazolidinônicos, na dose de 120µg/mL, foi observada a cada 24 horas durante 15 dias. Os vermes controles foram mantidos em meio de cultura acrescido de DMSO (1,5%), solvente utilizado para dissolução das drogas. As percentagens de mortalidade de vermes adultos ao final de 15 dias são mostrados na Tabela 3.

**FZ-4**, composto nitro substituído no anel benzilidênico, mostrou-se o mais ativo entre os compostos ensaiados, causando o efeito máximo em 12 dias. Enquanto que **FZ-2B**, derivado não substituído neste mesmo anel, não causou efeitos deletérios nos vermes adultos de *S. mansoni*, embora tenha provocado acentuada redução na motilidade. A substituição do grupo nitro do composto **FZ-4** pelo átomo de cloro provocou uma diminuição da susceptibilidade, ocasionando uma mortalidade de 24,32% em **FZ-3A**.

Os ensaios realizados com a série NN, substituída no nitrogênio em posição 3 do anel 2-tioxo-imidazolidin-4-ona por radicais benzila ou fenacila e em posição 5 por um radical *para*-bromo-benzilideno, demonstraram que o tratamento com o derivado NN-140 provocou a mortalidade de 82,50% dos vermes. Neste composto, quando comparado ao **NN-139**, inversamente ao que aconteceu com a série **FZ**, a substituição do átomo de cloro pelo grupo nitro aboliu a atividade do **NN-139** frente ao *S. mansoni*. Por sua vez, 31,11% dos vermes mostraram-se sensíveis ao composto **NN-142**, derivado *para*-nitro substituído. O derivado **NN-129** não apresentou atividade frente a *S. mansoni* mantidos *in vitro*. O grupo controle permaneceu viável durante os 15 dias de ensaio. Exame em microscópico invertido (60x) mostrou que todas as drogas causaram danos na superfície nos vermes, observando-se a presença de vesículas no tegumento semelhantes às citadas primeiramente por Shaw e Erasmus (1977). Este efeito foi dependente do tempo de exposição.

### **Conclusões**

O grupo nitro é considerado parasitofórico devido a sua indispensável, ou no mínimo favorável, contribuição para a atividade antiparasitária de um grande número de nitro-derivados, notadamente furanos, tiofenos, tiazóis e imidazóis. A presença deste grupo em derivados imidazolidina-2,4-dionas conferiu melhor atividade esquistossomicida,



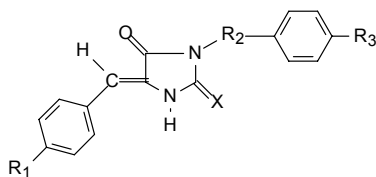
como observado em FZ-4. Os parasitas mostraram-se menos sensíveis aos derivados 2-tioxo-imidazolidinonas, nos quais procedeu-se a substituição do carbonila em posição 2 do anel heterocíclico pelo grupamento tioxo. Os efeitos causados pelos derivados imidazolidinônicos *in vitro* sobre a integridade do tegumento e viabilidade de vermes adultos de *S. mansoni*, assim como a interrupção da oviposição pelo oograma mostrando ausência de um dos estádios evolutivos, estimulam as pesquisas para síntese e avaliação biológica de novas moléculas.

### Referências Bibliográficas

- Badr, S.G.E., Pica-Mattoccia, L., Moroni, R., Angelico, M. Cioli, D. Effect of bile salts on oviposition *in vitro* by *Schistosoma mansoni*. **Parasitol. Res.** 85: 421-423, 1999.
- Barth, L.R., Fernandes, A.P.M., Ribeiro-Paes, J.T., Rodrigues, V. Effects of Goyazensolide during *in vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** 92(3): 427-429, 1996.
- Capron, A. Schistosomiasis: Forty years' war on the worm. **Parasitology Today** 14(10): 379-384, 1998.
- Cioli, D. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? **Curr. Opin. Infect. Dis.** 13(6):659-663, 2000.
- Cioli, D., Pica-Mattoccia, L., Archer, S. Antischistosomal drugs: past, present ... na future? **Pharmac. Ther.** 68(1):35-85, 1995.
- Coelho, P.M.Z., Pereira, L.H. *Schistosoma mansoni*: Preclinical studies with 9-acridanone-hydrazones in Cebus monkeys experimentally infected. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 33(1): 50-57, 1991.
- Coles, G.C., Liang, Y.S., Doenhoff, M.J. Evidence against rapid emergence of praziquantel resistance in *Schistosoma haematobium*, Kenya. **Emerg. Infect. Dis.** 7(6):1069-70, 2001.
- Christopherson, J.B. The successful use of antimony in billharziosis. Administered as intravenous injections of antimonium tartaratum (tartar emetic). **Lancet ii**: 325-327, 1918.
- Danso-Appiah, A., De Vlas, S.J. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. **Trends Parasitol.** 18(3):125-9, 2002.

- De Simone, C.A., Pereira, M.A., Luu-Duc, C., Pitta, I.R., Galdino, S.L., Menezes, E.H.C., Zukerman-Schpector, J. 3-Benzyl-5-(2-fluorobenzylidene)-imidazolidine-2,4-dione. **Acta Cryst.** C52: 2771-2772, 1996.
- De Simone, C.A., Zukerman-Schpector, J., Luu-Duc, C., Pitta, I.R., Galdino, S.L., Amorim, E.L.C. 3-(4-Bromobenzyl)-5-fluorobenzylidene)-imidazolidine-2,4-dione. **Acta Cryst.** C51: 2620-2621, 1995.
- Goes, A.J.S., Lima, M.C.A., Galdino, S.L., Pitta, I.R., Luu-Duc, C. Synthèse et activité antifongique des chlorobenzyl benzilidène thiazolidinediones et imidazolidinediones substituées. **Ann. Pharm. Fr.** 49(2):92-98, 1991.
- Grover, J.K., Vats, V., Uppal, G., Yadav, S. Anthelmintics: a review. **Trop. Gastroenterol.** 22(4):180-9, 2001.
- Katz, N., Pellegrino, J. Estudos de alguns aspectos da esquistossomose mansoni em macacos *Cebus* pelo método quantitativo. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, 16: 245-252, 1973.
- Katz, N., Pellegrino, J., Pompeu-Memória, J.M. Quantitative oogram method in *Cebus* monkeys experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.** 52(5): 917-919, 1966.
- Morgan, J.A., Dejong, R.J., Snyder, S.D., Mkoji, G.M., Loker, E.S. *Schistosoma mansoni* and Biomphalaria: past history and future trends. **Parasitology.** 123 Suppl:S211-2, 2001.
- Pellegrino, J., Faria, J. The oograma method for the screening of drugs in *S. mansoni*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 14: 363-369, 1965.
- Rogers, S.H., and Bueding, E. Hycanthon resistance: development in *Schistosoma mansoni*. **Science** 172(987): 1057-1058. 1971.
- Shaw, M.K., Erasmus, D.A. *Schistosoma mansoni*: differential cell death associated with *in vitro* culture and treatment with Astiban (Roche). **Parasitology** 75:101-109, 1977.
- WHO Drug Information, Model List of Essential Drugs (EDL), 11th edition, 13(4): 249-262, Dec. 1999.

**Tabela 1- Estrutura dos derivados imidazolidinônicos**



Composto	R <sub>1</sub>	X	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>
<b>FZ-2B</b>	H	O	CH <sub>2</sub>	Cl
<b>FZ-3A</b>	Cl	O	CH <sub>2</sub>	Cl
<b>FZ-4</b>	NO <sub>2</sub>	O	CH <sub>2</sub>	Cl
<b>NN-129</b>	Br	S	CH <sub>2</sub> C O	Cl
<b>NN-139</b>	Br	S	CH <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>
<b>NN-140</b>	Br	S	CH <sub>2</sub>	Cl
<b>NN-142</b>	Br	S	CH <sub>2</sub> C O	NO <sub>2</sub>

**Tabela 2-** Percentagem de ovos em 1g de fragmento intestinal de camundongos fêmeas sob ação da **FZ-4**, na dose única de 50mg/Kg e na dose de 10mg/Kg, a cada 24 horas durante cinco dias e administrada pelas vias oral (VO) e intraperitoneal (IP).

		IP		IP		VO		VO	
		Controle		mg/Kg 5x10 50		Controle		mg/Kg 5x10 50	
<b>Percentagem de ovos não viáveis por grama de fragmento intestinal</b>		18	41	87	45	23	36	79	66

**Tabela 3-** Susceptibilidade de vermes adultos de *S. mansoni* mantidos *in vitro* frente a derivados imidazolidinônicos na dose de 120µg/mL, durante 15 dias.

Composto	% Mortalidade
<b>FZ-2B</b>	0
<b>FZ-3A</b>	24,32
<b>FZ-4</b>	100
<b>NN-129</b>	0
<b>NN-139</b>	0
<b>NN-140</b>	82,50
<b>NN-142</b>	31,11



## CAPÍTULO 4

Effects of imidazolidinedione derivatives on the adult worms of  
*Schistosoma mansoni* maintained *in vitro*.

Submetido ao Journal of Helminthology  
USA

**Effects of imidazolidinedione derivatives on the adult worms of  
*Schistosoma mansoni* maintained *in vitro***

**Mônica C.P.A. Albuquerque<sup>1</sup>, Ildernando J. Oliveira<sup>2</sup>, Maíra G.R. Pitta<sup>2</sup>,  
Polliana G. Silva<sup>2</sup>, Elizabeth Malagueño<sup>3</sup>, José V. Santana<sup>4</sup>, João I. Irmão<sup>1</sup>,  
Maria C.A. Lima<sup>5</sup>, Ivan R. Pitta<sup>5</sup>, Suely L. Galdino<sup>+5</sup>**

<sup>1</sup>Departamento de Medicina Tropical, <sup>2</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, <sup>3</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, <sup>4</sup>Departamento de Biofísica, <sup>5</sup>Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP 50.670-901, Recife, Brasil.

**Key words:** Schistosomiasis, *Schistosoma mansoni*, Imidazolidinedione derivatives, Susceptibility, *In vitro* drug susceptibility test, *In vitro* cultivation

**Abstract:** In the search for compounds with schistosomicidal activity, the present work describes chemotherapeutic investigations on (Z)-3-benzyl-5-benzylidene-imidazolidine-2,4-dione derivatives with different substituents in position *para* of the benzylidene ring. This study clearly showed that FZ-4, a nitro derivative, was more active than chloro and unsubstituted compounds in producing mortality of *Schistosoma mansoni* adult worms maintained *in vitro*.

## Introduction

Schistosomiasis is one of the major diseases in the developing world. In several areas of South and Central America, Africa, and Asia, schistosomiasis has been considered a very important parasitic infection in human beings. At present, 200 million people are infected, among them 120 million are symptomatic and 20 million have severe disease. 600 million people are at risk situations in endemic regions. Anthelmintics are used for the treatment and prevention of the human schistosomiasis, considering that no suitable vaccines are yet commercially available (Chitsulo *et al* 2000). Only three drugs are currently available for the treatment of schistosomiasis and recommended by WHO: metrifonate, oxamniquine and praziquantel. Antimonials, hycanthone and niridazole now have been largely replaced because of their greater toxicity. Praziquantel is the drug of first choice for schistosomiasis in mass treatment programs due mainly to its activity against all schistosome species. Since some resistant strains to praziquantel have been described (Cioli 1998, Doenhoff *et al.* 2000) the availability of only two schistosomicidal drugs is very dangerous. Thus WHO and the scientific community have recommended to develop new drugs and to test the schistosomicidal properties of alternatives drugs (WHO 1998). In order to design a drug with a particular biological activity, the medicinal chemist requires a lead compound – a compound that shows useful pharmaceutical activity. The activity level may not be high and there may be undesirable side-effects, but the lead compound provides an starting point. By altering the structure, an useful drug may be developed with improved activity and reduced side-effects (Patrick 1997). Some nitrofurans were synthesized and tested to explore for antischistosomal drugs. In the early 1960s, furapromidium (F30066) was widely used in China on animal and human infections with *S. japonicum* (Werbel 1970).

Niridazole, chemically 1-(5-nitro-2-thiazolyl)-2-imidazolidinone, was employed in the second half of the 20th Century for the treatment of schistosomiasis infections, its efficacy is good but presents serious drawbacks, such as the need for multiple oral doses and the occurrence of side effects. *Trans*-5-amino-3-[2-(5-nitro-2-furyl)vinyl]-1,2,4-oxadiazole (SQ18506), a molecule bearing some structural similarity to niridazole, demonstrated antischistosomal activity (Robinson et al. 1970). In our laboratory we synthesized (*Z*)-3-benzyl-5-benzylidene-imidazolidine-2,4-dione compounds structurally related analogues of Niridazole with potential schistosomicidal activity. Using imidazolidinedione derivatives containing chloro and nitro substituents, we studied the susceptibility of *Schistosoma mansoni* adult worms.



## Materials and methods

The BH (BH - Belo Horizonte, MG, Brazil) strain of *S. mansoni* was routinely maintained at LIKA (Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami) by standard passage through *Biomphalaria glabrata* snails provided by the Department of Parasitology (Universidade Federal of Pernambuco, Brazil). Adult male and female schistosomes, obtained by perfusion using dissecting needles were recovered from the mesenteric and portal veins of untreated Swiss albino mice, weighing 18-22g, infected 8-12 weeks earlier (Duvall & Dewitt 1967). There are models available which can be used to study adult worms susceptibility of *Schistosoma mansoni* to drugs *in vitro* (Mercer & Chapell 1985). The worms were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma) buffered to pH 7.5, supplemented with HEPES (20mM), 10% foetal bovine serum (Cultilab), penicillin (100U/mL), and streptomycin (100mg/mL). Incubation was carried out at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The effect of imidazolidinedione compounds on the viability of the *S. mansoni* was examined by incorporating the drugs into the medium employed for parasite culture. The drugs, at appropriate concentrations, were dissolved in DMSO (1.5% v/v). This solvent concentration did not affect worms mortality, pairing, and motility. In all experiments two adult worm, paired or unpaired were placed in multi-well plastic tissue culture dishes. A minimum of 30 worms was used in each treated and control groups. Worms viability was observed under an inverted microscope until 15 days after drugs addition. Control worms just treated with DMSO were included in every experiment. Parasites were considered dead when no movement could be detected over a 3-min period. Strict aseptic techniques were used throughout the experiments.

The synthesis and physicochemical properties of (Z)-5-benzylidene-3-(4-chloro-benzyl)-imidazolidine-2,4-dione (**FZ-2B**), (Z)-3-(4-chloro-benzyl)-5-(4-chloro-benzylidene)-imidazolidine-2,4-dione (**FZ-3A**), and (Z)-3-(4-chloro-benzyl)-5-(4-nitro-benzylidene)-imidazolidine-2,4-dione (**FZ-4**) have been described (Goes et al. 1991, Lima et al. 1992). These compounds were synthesized by Knoevenagel condensation reaction from benzaldehyde compounds and 3-(4-chloro-benzyl)-imidazolidine-2,4-dione in the Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Departamento de Antibióticos (Fig. 1).

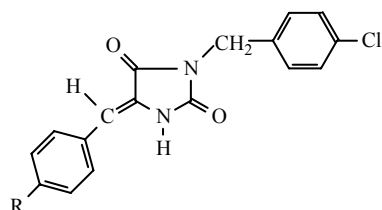


Fig. 1- Structure of imidazolidinedione derivatives: FZ-2B R=H; FZ-3A R=Cl; FZ-4 R=NO<sub>2</sub>.

## Results

The viability *in vitro* of adult worms was observed with different concentrations of the imidazolidinedione derivatives. **FZ-2B** at concentrations of 40, 60, and 100µg/mL had no effect on parasite mortality, but 8% mortality of male worms was observed after 120µg/mL addition to the culture. In the presence of **FZ-2B**, the motility of the worms was considerably reduced after 24 hours. The effects of incubation *in vitro* of **FZ-3A** and **FZ-4** against the BH isolate of *S. mansoni* are presented in Fig. 2 e 3, respectively. These figures show that the exposure to the drug resulted in the death of the parasites and this lethal effect was dose- and time-dependent. **FZ-3A** at three concentrations had little effect on parasite mortality. Better activity was shown with **FZ-4**, a drug that contains the nitro group in the *para* position of benzylidene ring. The control groups were not affected for up to 15 days of observation and all worms remained paired throughout the observation period and exhibited vigorous activity. The degree of cell damage caused by **FZ-2B**, **FZ-3A**, and **FZ-4** was more severe than the effect observed in worms without drug. Light microscope observations of whole worms showed a progressive tegumental vesiculation of the parasites, analogous to the tegumental ballooning observed by Shaw & Erasmus (1977). The amount and extent of this damage was proportional to the time exposure.

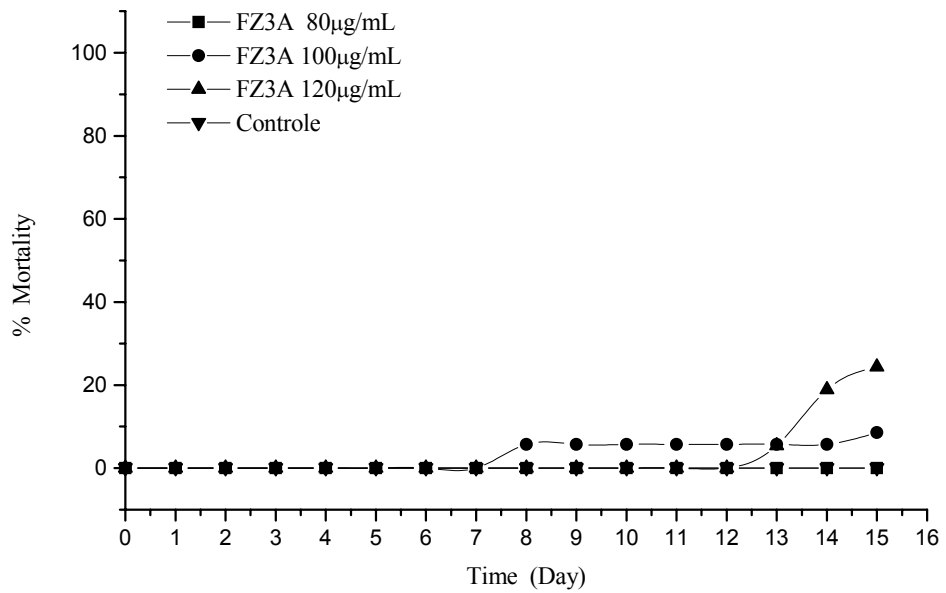


Fig 2- The efficacy of **FZ-3A** at 80, 100, and 120µg/mL against adult worms of *Schistosoma mansoni* maintained *in vitro* for 15 days.

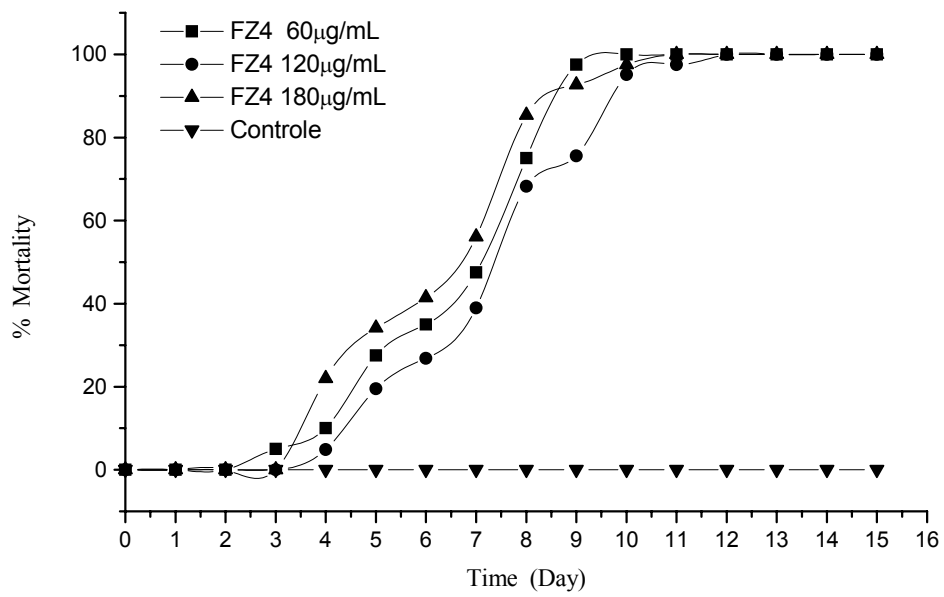


Fig 3- The efficacy of **FZ-4** at 60, 120, and 180µg/mL against adult worms of *Schistosoma mansoni* maintained *in vitro* for 15 days.

## Discussion

The structural formula of an organic compound, in principle, contains coded within it all of the information which predetermines the chemical, physical, and biological properties of that compound. Biological activity may depend not only on how well the compound interacts with its receptor, but also on a whole range of physical features such as basicity, lipophilicity, electronic distribution, and size. The idea of varying substituents is to attach a series of substituents such that these physical features are varied one by one. In reality, it is rarely possible to change one physical feature without affecting another. For aromatic compounds, a favorite approach is to vary the substitution pattern. This may give increased activity in the relevant binding groups are not already in the ideal position for bonding.

The electronic effects of various substituents will clearly have an effect on a drug's ionization or polarity. This in turn may have an effect on how easily a drug can pass through cell membranes or how strongly it can bind to a receptor.

The nitro group gives more activity on **FZ-4** than that unsubstituted and chloro substituted compounds in the same position. In the *para* position, the electron withdrawing power of the nitro group is due to the resonance influence. An electron withdrawing nitro group will affect the basicity of an aromatic compound more significantly if it is in the *para* position rather than the *meta* position. It is know that varying the basicity of a nitrogen atom may have a biological effect (Andrews et al. 1984).

The nitro group is considered as parasitophoric because it is an indispensable, or at least very favorable, factor for the antiparasitic activity of a great number of nitro

derivatives, mainly of furans, thiophenes, and thiazoles. The main effects exerted by the nitro group are physicochemical, biochemical, and pharmacological (Korolkovas 1988).

If the substitution pattern is ideal, then we can try varying the substituents themselves. Substituents of different sizes and electronic properties are usually tried to see if steric and electronic factors have any effect on activity. It may be that activity is improved by having a more electron withdrawing substituent, in which case nitro substituent might be tried in place of a chloro substituent.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq.

<sup>+</sup>Corresponding author. Fone/Fax: +55-21-32718346. E-mail: [suelygaldino@aol.com](mailto:suelygaldino@aol.com)



## References

- Andrews, P. R., Craik, D. J. & Martin, J. L. (1984) Functional group contributions to drug-receptor interactions. *Journal of Medical Chemistry* 27: 1648-1657.
- Chitsulo, L., Engels, D., Montresor, A. & Savioli, L. (2000) The global status of schistosomiasis and its control. *Acta Tropica* 77: 41-51.
- Cioli, D. (1998) Chemotherapy of schistosomiasis: an update. *Parasitology Today* 14: 418-422.
- Doenhoff, M., Kimani, G. & Cioli, D. (2000) Praziquantel and the control of schistosomiasis. *Parasitology Today* 16: 364-366.
- Duvall, R. H. & Dewitt, W. B. (1967) An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 16: 483-486.
- Goes, A. J. S., Lima, M. C. A., Galdino, S. L., Pitta, I. R. & Luu-Duc, C. (1991) Synthèse et activité antifongique des chlorobenzyl benzyldène thiazolidinediones et imidazolidinediones substituées. *Annales Pharmaceutiques Françaises* 49: 92-98.
- Korolkovas, A. (1988) *Essentials of Medicinal Chemistry*. 2nd ed., Wiley, New York, xii +1204 pp.

Lima, M. C. A., Costa, D. L. B., Goes, A. J. S., Galdino, S. L., Pitta, I. R. & Luu-Duc, C. (1992) Synthèse et activité antimicrobienne de dérivés chlorobenzyl benzyldène imidazolidinediones et thiazolidinediones substituées. *Pharmazie* 47: 182-184

Mercer, J. G. & Chapell, L. M. (1985) *Schistosoma mansoni*: effect of maintenance *in vitro* on the physiology and biochemistry of adult worms. *Parasitology* 90: 339-349.

Patrick, G. L. (1997) *An introduction to medicinal chemistry*. Oxford University Press, Oxford, xii + 336 pp.

Robinson, C. H., Bueding, E. & Fisher, J. (1970) Relationship between structure, conformation, and antischistosomal activity of nitroheterocyclic compounds. *Molecular Pharmacology* 6: 604-16.

Shaw, M. K. & Erasmus, D. A. (1977) *Schistosoma mansoni*: differential cell death associated with *in vitro* culture and treatment with Astiban (Roche). *Parasitology* 75: 101-109.

Werbel, L. M. (1970) Chemotherapy of schistosomiasis. *Top Med Chem* 3: 125-169.

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



## CAPÍTULO 5

Tegumental alterations in adult *Schistosoma mansoni* treated with imidazolidine derivatives.

Submetido a Acta Tropica  
Elsevier Suécia

**TEGUMENTAL ALTERATIONS IN ADULT SCHISTOSOMA  
MANSONI TREATED WITH IMIDAZOLIDINE DERIVATIVES**

Mônica C. P. A. Albuquerque<sup>a\*</sup>, Suely L. Galdino<sup>b</sup>, Ivan R. Pitta<sup>b</sup>, Maria do Carmo A. Lima<sup>b</sup>, Elizabeth Malagueño<sup>ce</sup>, José V. Santana<sup>de</sup> and Christina A. Peixoto<sup>fe</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Medicina Tropical, <sup>b</sup>Departamento de Antibióticos,  
<sup>c</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, <sup>d</sup>Departamento de Biofísica,  
<sup>e</sup>Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da Universidade Federal de Pernambuco. <sup>fe</sup>Departamento de Patologia e Biologia Celular, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), Av. Moraes Rego s/n, Recife, Brazil.

\*Mailing adress:

Dr. Mônica C.P.A. Albuquerque

FAX: 55 81 32718528

CEP. E-mail: [jcmonica@nlink.com.br](mailto:jcmonica@nlink.com.br)

## **Abstract**

Ultrastructural observations were made on the tegument of Schistosoma mansoni after 24 h treatment with three imidazolidine derivatives. Treatment with FZ-4 at 120µg/ml, the general changes observed in male worms were a body wrinkled, damage of the oral sucker, decrease in the size and disorganization of the tubercles, whereas in females the most prominent alteration was severe tegumental erosion with peeling or rupture of the surface. Treatment with JT-59 caused slight damage to the tegument. Male worms showed shortening of ridges in close proximity of the tubercles and numerous diminutive blebs emerging from the tegument; female worms showed peeling away and focal erosion of the surface. Treatment with JT-62, induced severe tegumental damage in male worms including erosion with exposure of internal structures. Female worms showed throughout all tegument innumerous protuberances and deep grooves.

The range of ultrastructural abnormalities in the S. mansoni tegument caused by imidazolidine derivatives possibly indicated a novel antischistosomal compounds.

Key-words: S. mansoni, imidazolidine derivatives, scanning electron microscopy.

## 1. Introduction

The tegument of Schistosoma mansoni is an important structure involved in nutrition absorption (Pappas and Read, 1975; Carlisle and Weisberg, 1978), in secretion of some products (Wilson and Barnes, 1979), and in protection from the immune response of the host (Cox, 1979; Lima et al, 1994). For that reason, the tegument is of crucial importance as a target for antischistosomal drugs.

Several studies have demonstrated that drugs active against schistosomiasis promote severe damage to the tegument. Praziquantel, the drug of choice for schistosomiasis, produces rapid and extensive tegumental alterations (Mehlhorn et al, 1981; Lima et al, 1994; Fallon et al, 1996). Similar tegumental alterations have been described with the use of oxamniquine to treat S. mansoni infections (Kohn et al, 1982; Fallon et al, 1996). Recently, the drug artemether, a derivative of artemisinin have been shown to cause extensive and severe damage to the tegument of adult and juvenile forms of S. mansoni (Xiao et al, 2000a; Xiao et al, 2001).

Others kinds of compounds that show antischistosomal activities are imidazolidine derivatives. In fact, several biological activities have been related to imidazolidine compounds. The phenytoin (5,5-diphenyl-2,4 imidazolidinedione) is used largely as anticonvulsant (Hardman, et al, 1996). Others derivatives present activities such as platelet aggregation inhibition (Barraclough et al, 1989), bactericidal and fungicidal (Marton et al, 1993), hypoglycaemic (Ware 1950; Soliman et al, 1981), and tuberculostatic effects (Brandão et al, 1997). The antischistosomal activity of imidazolidinone derivatives was attained from niridazol, the 1-(5-nitro-2-thiazolyl)-2-imidazolidinone (Lambert, 1964), which had been employed in the sixties and seventies's. Others imidazolidine compounds also showed antischistosomal

activity in mice infected with S. mansoni (Werbel and Elslager, 1977; Benazet and Leroy, 1974). These observations induced us to test new imidazolidine derivatives synthesized in the Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco.



## 2. Materials and methods

### 2.1. Parasites and mice

The BH (BH - Belo Horizonte, MG, Brazil) strain of *S. mansoni* was routinely maintained at Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami by standard passage through *Biomphalaria glabrata* snails provided by the Department of Tropical Medicine (UFPE). Adult male and female schistosomes were obtained by perfusion using dissecting needles from the mesenteric and portal veins of Swiss albino mice, which had been infected 8-12 weeks earlier; weigh at infection 18-22 g (Duvall and Dewitt, 1967).

### 2.2. Drugs

The synthesis and physicochemical properties of (Z)-3-(4-chloro-benzyl)-5-(4-nitro-benzylidene)-imidazolidine-2,4-dione (FZ-4) has been described (Goes et al, 1991; Lima et al, 1992). (Z)-3-(4-chloro-benzyl)-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-2-thioxo-imidazolidin-4-one (JT-59) and (Z)-5-(4-fluoro-benzylidene)-1-methyl-3-(4-phenyl-benzyl)-2-thioxo-imidazolidin-4-one (JT-62) are original compounds. These derivatives were synthesized by the Knoevenagel condensation reaction from benzaldehyde compounds and substituted imidazolidines.

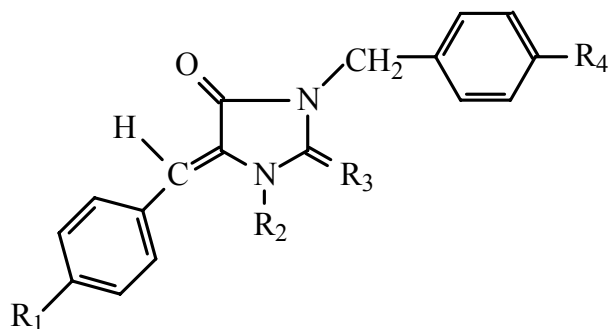


Fig. 1- Structure of imidazolidine derivatives. FZ-4:  $R_1=NO_2$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=O$ ,  $R_4=Cl$ ; JT-59:  $R_1=F$ ,  $R_2=CH_3$ ,  $R_3=S$ ,  $R_4= Cl$ ; JT-62:  $R_1=F$ ,  $R_2=CH_3$ ,  $R_3=S$ ,  $R_4=C_6H_5$

### 2.3. In Vitro Treatment

To study the susceptibility of adult worms S. mansoni to drugs in vitro we used methods previously described (Mercer and Chapell, 1985). The worms were maintained in RPMI-1640 medium (Sigma) buffered to pH 7.5, supplemented with HEPES (20mM), 10% foetal bovine serum (Cultilab), penicillin (100U/ml), and streptomycin (100mg/ml). Incubation was carried out at 37°C in a humid atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. The effect of imidazolidine compounds on the viability of the S. mansoni was examined by addition of the drugs into the medium employed for parasite culture. The drugs were dissolved in DMSO (1.5% v/v) at 60, 80, 120, 180 and/or 240 µg/ml. This solvent concentration did not affect worms mortality, pairing, and motility. In all experiments, female and male adult worms, paired or unpaired, were placed in multi-well plastic tissue culture dishes. Worms viability at 120 µg/ml was observed under a inverted microscope until 5 days after drug addition. Control worms treated only with DMSO were included in every experiment. Parasites were considered dead when no movement could be detected over a 3-min period. Strict aseptic techniques were used throughout the experiments. The drug concentration chosen for scanning electron microscopy was 120 µg/ml, since for the most imidazolidine derivatives tested in our laboratory, mortality began to be observed at this dose.

## 2.4. Scanning Electron Microscopy

At 24 h after treatment with FZ-4, JT-59 and JT-62 at 120 µg/ml worms were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) for 2 h at room temperature. Then, they were washed twice in the same buffer and post-fixed in 1% osmium tetroxide in phosphate buffer for 1 h at room temperature. All worms were dehydrated in ethanol, washed several times in 100% ethanol, critical-point-dried in CO<sub>2</sub>, mounted on stubs, coated with gold, and examined in a JEOL 25SII scanning electron microscope.

### 3. Results

The viability *in vitro* of adult worms was observed with different concentrations of the imidazolidine derivatives. The effects of incubation *in vitro* of FZ-4, JT-59 and JT-62 against the of S. mansoni are presented in Fig. 1 and 2. JT-59 and JT-62 at concentration of 60µg/ml had no effect on parasite mortality. These figures show that the exposure to the drug JT-62 resulted in the death of the parasites and this lethal effect was dose- and time-dependent. The best activity was shown with JT-62, the drug that contains the group phenyl in the para position of the benzyl ring. JT-59 and FZ-4 at four concentrations had little effect on parasite mortality. Control groups were not affected for up to 15 days of observation and all worms remained paired throughout the observation period and exhibited vigorous activity.

The morphological features of the tegument in untreated control adult S. mansoni (Fig. 3 a,b) were similar to those described by others (Machado-Silva et al, 1997; Xiao et al, 2000a,b).

Effect of FZ-4 – 24 h after *in vitro* treatment, the drug-induced changes were observed on the entire surface of the body. The general changes were body wrinkled, damage of the oral sucker, decrease in the size and disorganization of the tubercles (Fig. 4a). In all individuals observed, striking alterations were observed in the tubercles due to their total collapse and loss of the spines and also to numerous diminutive blebs emerging from the tegument around (Fig. 4b).

In female worms the most prominent alteration was the tegumental severe erosion with peeling or rupture of the surface (Fig. 4c). Complete disappearance of sensorial structures and formation of deep grooves were also seen (Fig. 4d).

Effect of JT-59 – After 24 h treatment all worms showed slight damage to the tegument. Male worms showed shortening of ridges with close proximity of the tubercles (Fig. 5a). Some of the tubercles presented a smooth appearance due to the absence of spines (Fig. 5b). Numerous diminutive blebs emerging from the tegument were also observed (Fig. 5b). Female worms showed peeling away and erosion of the focal tegument (Fig 5c,d).

Effect of JT-62 – Erosion with exposure of internal structures of the tegument was observed in male worms at 24 h after treatment (Fig. 6a). The tubercles showed severe damage with loss of spines, decrease in size and collapse (Fig. 6b). In female worms, throughout tegument innumerable protuberances and deep grooves were observed revealing a severe damage of the worm surface (Fig.7).

#### 4. Discussion

At present, praziquantel and oxamniquine are the only antischistosomal compounds readily available. However, there is a pressing need for research and development of novel antischistosomals, since have been shown the development of tolerance or resistance to oxamniquine and praziquantel (Cioli., 2000).

In the present study of females and males of S. mansoni, the tegumental alterations induced by imidazolidines were assessed by means of scanning electron microscopy. All drugs studied produced severe and extensive damage to the tegument characterized by focal or general peeling and fusion of tegumental ridges, as well as erosion and collapse of the damaged tegument. JT-62 and FZ-4 were substantially more active than the drug JT-59 in causing damage to the tegument of adult S. mansoni. Therefore, the worm tegument is the critical target for the imidazolidine derivatives as for others antischistosomal drugs until now studied (Xiao et al, 2000a,b; 2001; Irie et al, 1989; Leitch et al, 1984). Otherwise, in vivo, the loss of the worm integrity due to occurrence of tegumental lesions and erosions, could be followed by an exposure of the surface to lethal attack by host cell.

The pattern of tegumental damage resulting from imidazolidine derivatives treatment was similar to that previously observed in S. mansoni adults and schistosomules treated with praziquantel (Mehlhorn et al, 1981; Irie et al, 1989; Lima et al, 1994; Xiao et al, 2000b), oxamniquine (Kohn et al, 1982; Fallon et al, 1996) and artemether (Xiao et al, 2000a; Xiao et al, 2001). Although, the damage caused by JT-62 and FZ-4 was more severe than the antischistosomal recommended drugs.

Comparison of worm viability and the tegumental morphology indicated that lesion may not always results in death, but killing the worms

appears to be related directly to the intensity to the damage. Indeed, the JT-59 derivative which in all studied doses induced the minor rate of mortality, also produced discrete tegumental lesions as diminutive vesicles. Other antischistosomal drugs and host antibodies have been described to induced surface blebbing in Schistosome. This phenomenon represents a tentative of repair mechanism when the worm suffer mild surface attack (Leitch et al, 1984).

The present study showed that imidazolidine derivatives are capable of inducing a range of ultrastructural abnormalities in the S. mansoni tegument. However, further biochemical and physiological analysis are necessary to elucidate the mechanism of action by which they breakdown the worm architecture.

## References

Barraclough, P., Caldwell, A.G., Harris, C.J., Jackson, W.P. and Whittle, B.R.J. (1989) Synthesis and platelet aggregation inhibiting activity of 1'-carboxyl modified hydantoin prostaglandin analogues. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 1815-1821.

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

Brandão, S.S.F., Rocha-Filho, J.A., Chantegrel, J., Albuquerque, J.F.C., Ximenes, E.A., Galdino, S.L., Pitta, I.R., Perrissin, M., Luu-Duc, C. (1997) Synthèse et structure des arylaso-imidazolidines et arylidènethiazolidines substituées. *Ann. Pharm. Fr.* 55, 206-211.

Cioli, D. (2000) Praziquantel: is there a real resistance and are there alternatives? *Curr. Opin. Infect. Dis.* 13, 659- 663.

Carlisle S. and Weisberg LS. (1978) S. mansoni: tracer studies in mice. *Parasitol.* 44, 124-35.

Cox, F.E.G. (1979) Death of a Schistosome. *Nature* 278, 401-402

Duvall, R.H., Dewitt, W.B. (1967) An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 16, 483-486.



Fallon, P.G., Fookes, R.E. and Wharton, G.A. (1996) Temporal differences in praziquantel and oxamniquine induced tegumental damage to adult *Schistosoma mansoni*: Implication for drug-antibody synergy. *Parasitol.* 112, 47-58.

Goes, A.J.S., Lima, M.C.A., Galdino, S.L., Pitta, I.R., Luu-Duc, C. (1991) Synthèse et activité antifongique des chlorobenzyl benzylidène thiazolidinediones et imidazolidinediones substituées. *Ann. Pharm. Fr.* 49, 92-98.

Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W. and Gilman, A.G. (1996) In: Godman & Gilman (Eds.) – *As bases farmacológicas da terapêutica*. México: McGraw-Hill Companies, 9<sup>a</sup> edição, pp. 436.

Irie, Y., Utsunomiya, H., Tanaka, M., Ohmae, H., Nara, T. and Yasuraoka, K. (1989) *Schistosoma japonicum* and *S. mansoni*: Ultrastructural damage in the tegument and reproductive organs after treatment with levo- and dextro-praziquantel. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41, 204-211.

Kohn, A., Lopez-Alvarez, M.L. and Katz, N. (1982) Transmission and scanning electron microscopical studies in the tegument of male *S. mansoni* after oxamniquine treatment. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.* 57, 285-291.

Lambert, C.R. (1964) Chemotherapy of experimental *S. mansoni* infection with a nitro-thiazole derivative CIBA 32,644-Ba. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 58, 292-303.

Leitch, B. and Probert, A.J. (1984) Schistosoma haematobium: Amoscanate and adult worm ultrastructure. *Exp. Parasitol.* 58, 278-289.

Lima, M.C.A., Costa, D.L.B., Goes, A.J.S., Galdino, S.L., Pitta, I.R., Luu-Duc, C. (1992) Synthèse et activité antimicrobienne de dérivés chlorobenzyl benzyldène imidazolidinediones et thiazolidinediones substituées. *Pharmazie.* 47, 182-184.

Lima, S.F.L.Q., Vieira, L.Q., Harder, A. and Kusel J.R.. (1994) Altered behaviour of carbohydrate-bound molecules and lipids in areas of the tegument of adult S. mansoni worms damaged by praziquantel. *Parasitol.* 109, 469-477.

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

Machado-Silva, J.R., Lanfredi, R.M. and Gomes, D.C. (1997). Morphological study of adult males worms of S. mansoni Sambon, 1907 by scanning electron microscopy. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz* 92, 647-653.

Mehlhorn, H., Becker, B., Andrews, P., Thomas, H. and Frenkel, J. K. (1981) In vivo and in vitro experiments on the effect of praziquantel on S. mansoni: A light and electron microscopic study. *Arzneimittel-Forschung* 31, 544-554.

Mercer, J.G. and Chapell, L.M. (1985) S. mansoni: effect of maintenance in vitro on the physiology and biochemistry of adult worms. Parasitol. 90,339-349.

Pappas, P.A. and Read, C.P. (1975) Membrane transport in helminth parasites: A review. Exp. Parasitol. 37, 469-530.

Soliman, R.; Feid-Allah, H.M. and Mohamed, H.F. (1981) Preparation and antidiabetic activity of cyclic sulfonylthiourea derivatives. J. Pharm. Sci. 70, 952-956.

Xiao, S., Binggui, S., Chollet, J., Utzinger, J. and Tanner, M. (2000a) Tegumental changes in adult S. mansoni harbored in mice treated with artemether. J. Parasitol. 86, 1125-1132.

Xiao, .S., Binggui, S., Chollet, J. and Tanner, M. (2000b) Tegumental changes in adult S. mansoni harboured in mice treated with praziquantel enantiomers. Acta Trop. 76, 107-117.

Xiao, S., Binggui, S., Chollet, J., Utzinger, J. and Tanner, M. (2001) Tegumental alterations in juvenile S. mansoni harboured in hamsters following artemether treatment Parasitol. Intern. 50, 175-183.

Ware, E. (1950)The chemistry of hydantoins. Chem. Rev. 46, 403-470.

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

Wilson, R.A. and Barnes, P.E. (1979) Synthesis of macromolecules by the epithelial surfaces of *S. mansoni*: An autoradiographic study. *Parasitol.* 78, 295-310.

Figure 1. Effect on worm viability related to the imidazolidine derivatives concentration after 5 days treatment

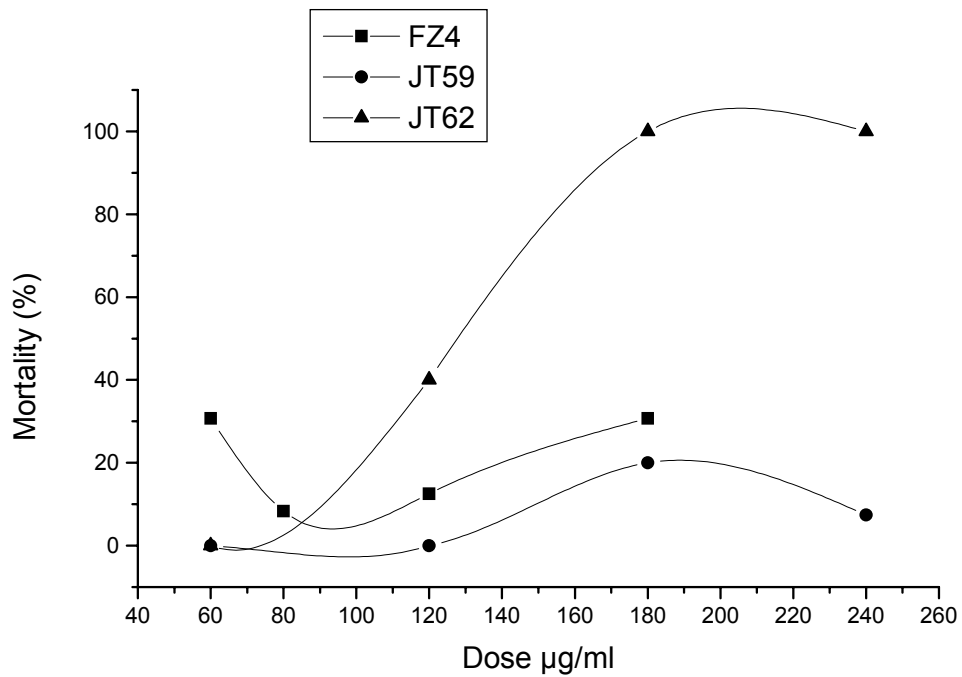
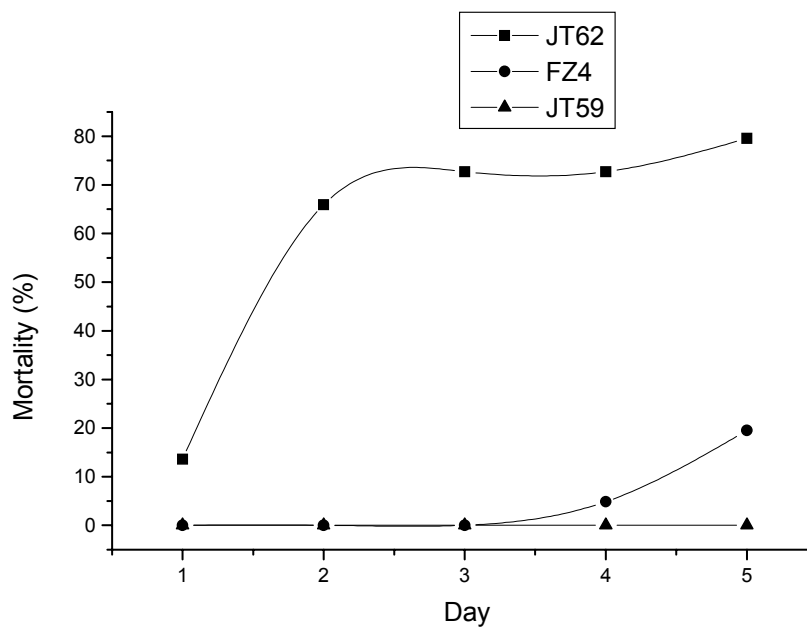


Figure 2. Time dependence of the effect on worm viability after treatment at 120 µg/ml imidazolidine derivatives



## Legends

Figure 3. Scanning electron micrographs of S. mansoni tegument. (a) tegument of untreated control male worm (1,050X); (b) Tegument of untreated control female worm (990X)

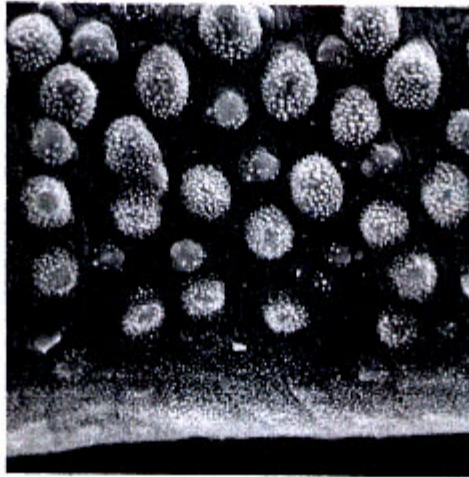
Figure 4. Tegumental alterations of S. mansoni 24 h after FZ-4 treatment. (a) surface of male showing damage in oral sucker, and body wrinkled (150X); (b) disorganization, collapse of the tubercles (1,500X); (c) surface of female showing severe extensive erosion, as well as exposure of circular muscle layer (1,500X); (d) female surface characterized by deep grooves and erosion (1,500X)

Figure 5. Tegumental alterations of S. mansoni 24 h after JT-59 treatment. (a) surface of male showing shortening of ridges with close proximity of the tubercles ( 2,250X); (b) tubercles with smooth appearance, and numerous diminutive blebs emerging from the male tegument (3,000X); (c) surface of female showing focal damage (450X); (d) female tegument characterized by peeling away and erosion (975X)

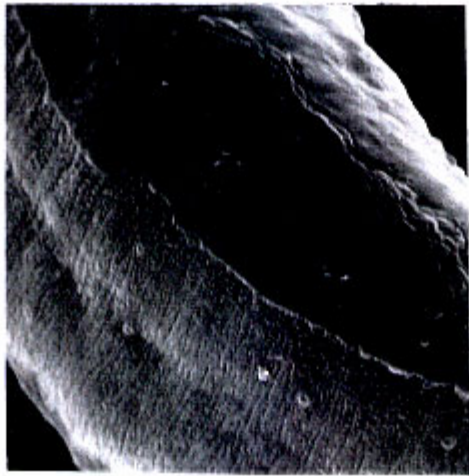
Figure 6. Tegumental alterations of S. mansoni 24 h after JT-62 treatment (a) surface of male worm showing erosion with exposure of internal structures (525X); (b) male surface with severe damaged tubercles and loss of spines (2,250X)

Figure 7. Tegument of S. mansoni 24 h after JT-62 treatment. Female worm showing protuberances and deep grooves (1,500X)

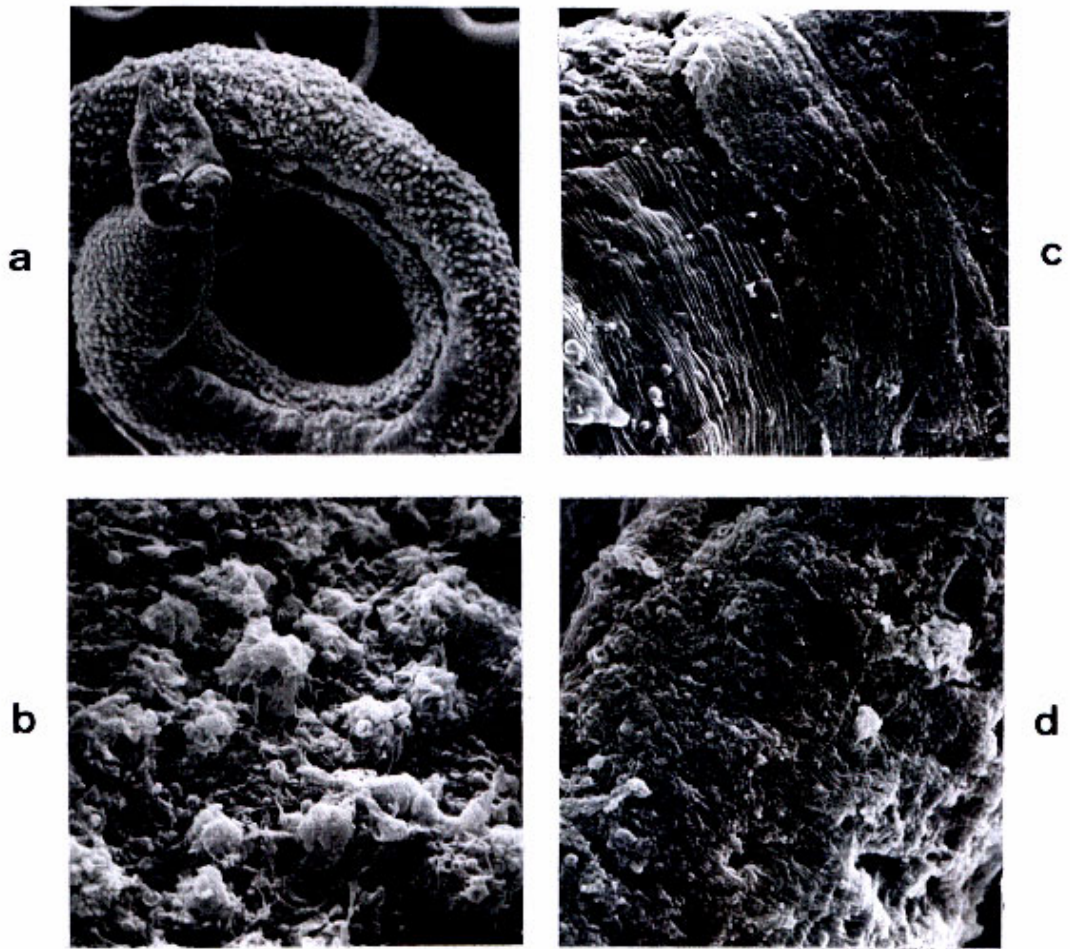
a



b

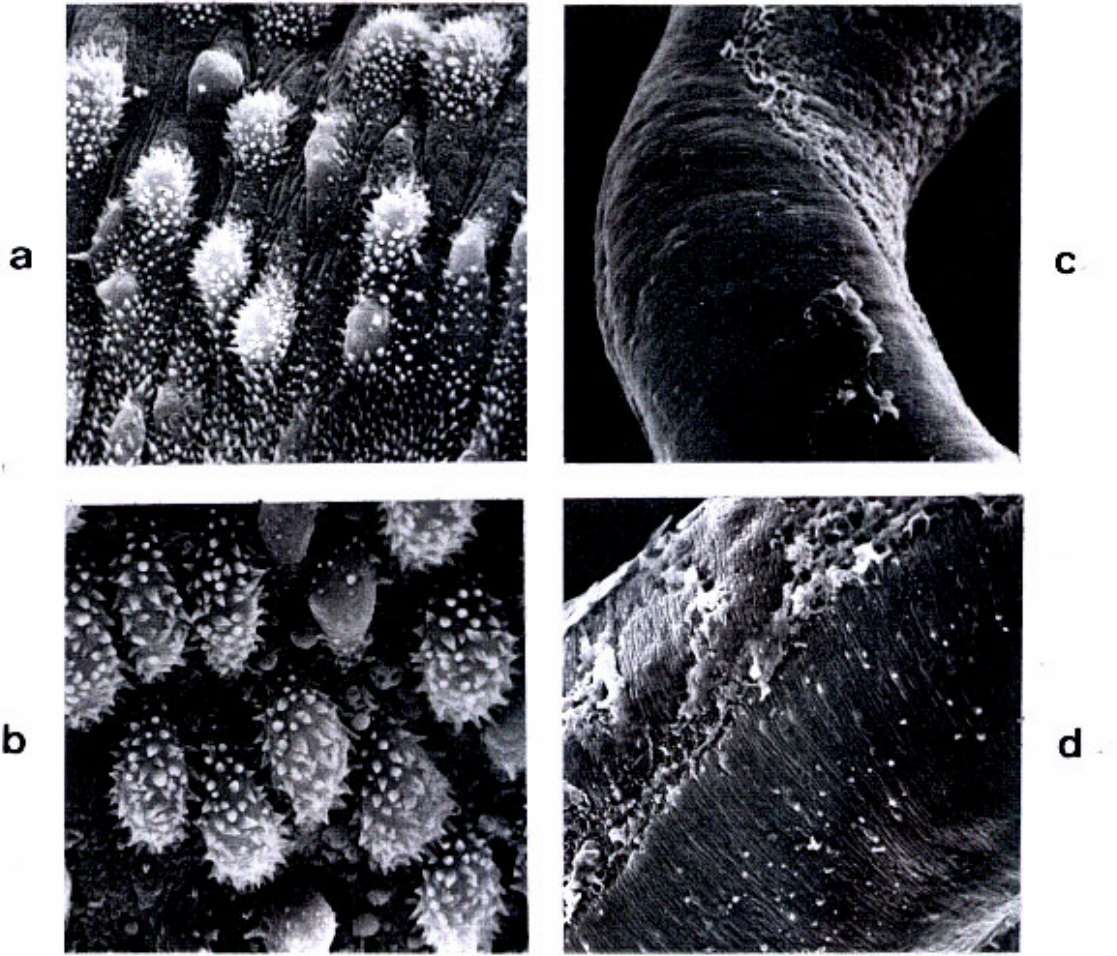


**FIGURA 3**



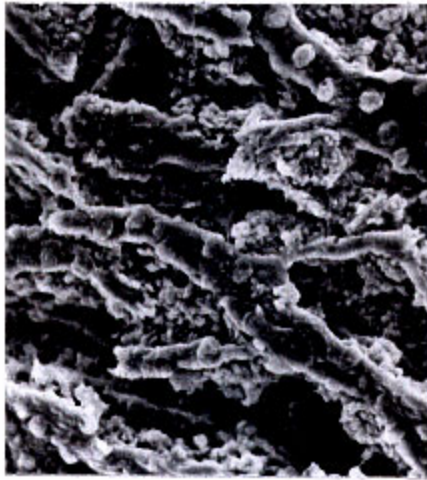
**FIGURA 4**



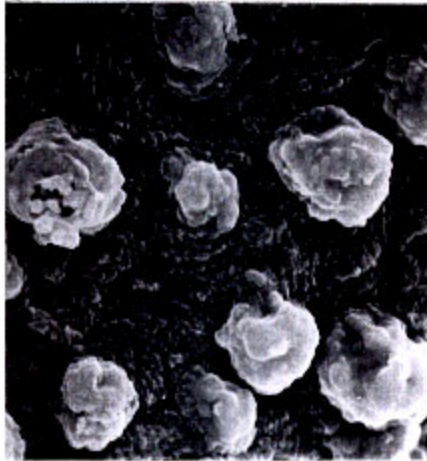


**FIGURA 5**

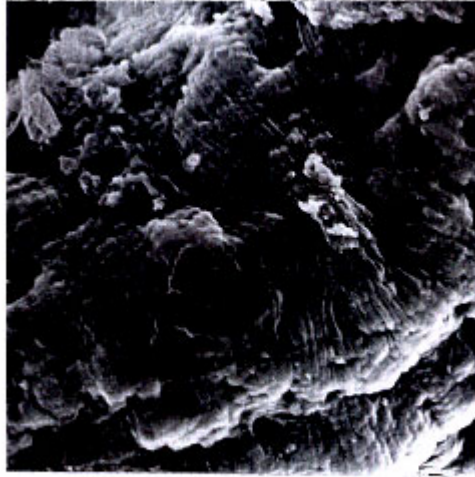
a



b



**FIGURA 6**



**FIGURA 7**



## CAPÍTULO 6

*Schistosoma mansoni*: efeitos de uma imidazolidina-2,4-diona em  
receptores colinérgicos

A ser submetido

## **Schistosoma mansoni: efeitos de uma imidazolidina-2,4-diona em receptores colinérgicos**

*Schistosoma mansoni: effects of an imidazolidine-2,4-dione in cholinergic receptors*

Mônica C.P.A. Albuquerque<sup>1</sup>, João I. Irmão<sup>1</sup>, José V. Santana<sup>2</sup>,  
E. Malagueño<sup>2</sup>, Maria C.A. Lima<sup>3</sup>, Ivan R. Pitta<sup>3</sup> e Suely L. Galdino<sup>3</sup>

**Resumo** Os estudos sobre os efeitos do composto 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (FZ-4) em receptores colinérgicos de *Schistosoma mansoni* foram efetuados através da observação visual da atividade motora de vermes adultos machos mantidos in vitro. O estímulo da motilidade provocado por FZ-4 foi bloqueado pelo colinomimético carbachol. O sistema nervoso singular do schistosoma, com características farmacofisiológicas únicas, pode ser usado para estudo de drogas destinadas a uso humano e animal e como efetivo ponto de ataque de quimioterápicos.

**Palavras-chaves:** *Schistosoma mansoni*. Imidazolidinona. Efeito colinérgico.

**Abstract** Neuropharmacological studies of compound 3-(4-chloro-benzyl)-5-(4-nitro-benzylideno)-imidazolidine-2,4-dione (FZ-4) were conducted in vitro using visual observations of motor activity. The stimulation of motor activity by FZ-4 was blocked by the cholinomimetic agent carbachol. The simple nervous system of the schistosome appears to have many unique pharmacofisiological features which may make it a useful model for the study of drugs for human and animal uses, as well as providing an effective point for chemotherapeutic attack.

**Key-Words:** *Schistosoma mansoni*. Imidazolidinone. Effect cholinergic.

A esquistossomose mansoni, doença endêmica causada por platelmintos do gênero *Schistosoma*, constitui um importante problema de saúde pública em cinquenta e dois

países da América do Sul, do Caribe e da região oriental do Mediterrâneo (WHO, 1998), atingindo hoje mais de seis milhões de brasileiros (Katz e Peixoto, 2000). O sistema nervoso dos trematódeos, aos quais pertencem as espécies do gênero *Schistosoma*, apresenta grande interesse químico-medicinal pelo fato de representar ponto de ataque para novos quimioterápicos (Halton e Gustafsson, 1996).

Existem atualmente razoáveis evidências sugerindo que a 5-hidroxitriptamina (5-HT) funciona como neurotransmissor excitatório do *S. mansoni*, causando aumento da atividade motora desse parasito humano (Bennett *et al.*, 1969 Hillman e Senft, 1973). Por outro lado, à acetilcolina (ACh) é atribuída uma função de neurotransmissor inibitório, causando paralisia flácida (Barker *et al.*, 1966; Fetterer *et al.*, 1977). Não apenas a acetilcolina, mas também os agentes colinomiméticos arecolina e carbacol produzem paralisia flácida em vermes adultos de *S. mansoni* mantidos *in vitro*. Mellin e colaboradores (1983) demonstraram que a atividade elétrica extracelular deste parasito cessa imediatamente após tratamento com 0,1M de carbacol, mesmo na presença de uma concentração estimulante de 5-HT.

## MATERIAL E MÉTODOS

**Droga.** O composto 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidina-2,4-diona (FZ-4) (Figura 1) foi fornecido pelo Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos, cuja síntese e propriedades físico-químicas estão descritos em Lima e colaboradores (1992).

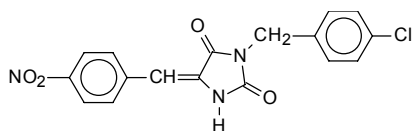


Figura 1- Estrutura química do composto FZ-4

**Animais.** A cepa de *S. mansoni* foi rotineiramente mantida no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), através de passagens sucessivas em caramujos *Biomphalaria glabrata* fornecidos pelo Departamento de Medicina Tropical. Vermes adultos machos de schistosoma foram obtidos por perfusão de veias porto-mesentéricas de camudongos suíços *Mus musculus* não tratados, oriundos do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (FIOCRUZ), pesando 18-22 gramas, infectados previamente por 8-12 semanas (Olivier e Stirewalt, 1952; Duvall e Dewitt, 1967).

**Atividade motora.** Em todos os experimentos, seis vermes machos de schistosoma foram colocados em placas de cultura de 35mm contendo 3mL de meio RPMI 1640 (Sigma), 10% de soro bovino fetal e tamponado com 20mM de HEPES. Após uma hora de adaptação dos vermes às condições experimentais, com o objetivo de se alcançar o equilíbrio motor dos parasitos,  $3 \times 10^{-4}$ M de FZ-4 foi adicionada ao meio. A motilidade dos vermes foi avaliada visualmente 15 e 30 minutos após adição da droga.

Conforme indicado em Mellin e colaboradores (1983), a motilidade foi registrada atribuindo-se os seguintes escores: 4 (extremamente hiperativo), 3 (hiperativo), 2 (ativo), 1 (normal) e 0 (paralisado). A atividade motora 1 (normal), conferida ao grupo controle, não submetido a tratamento, consistiu de ondas peristálticas suaves, com contrações ao longo do comprimento do verme e ocasionais movimentos chicoteantes; a porção cefálica movendo-se ocasionalmente, com a ventosa oral frequentemente aderida à superfície da placa. Os estados de paralisia e de excitação foram variações observadas relativas a este comportamento normal.

## RESULTADOS

Vermes adultos machos de *Schistosoma mansoni* em presença de  $3 \times 10^{-4}$ M de FZ-4 apresentaram aumento da atividade motora quando comparado ao grupo controle (Figura 2). Esta alteração motora foi caracterizada por freqüentes e



volumosas ondas peristálticas, que percorriam todo o corpo dos parasitos e acompanhadas de movimentos rítmicos alternados contrácteis e distendidos com o corpo em forma de C, de forma que dificultava a adesão das ventosas à base das placas. Após 30 minutos de exposição ao FZ-4, os vermes mostraram-se mais retilíneos e os movimentos mais intensos. Após a adição de  $10^{-3}$ M de carbacol, observou-se uma redução da atividade motora a qual atingiu completa paralisia aos 15 minutos de exposição ao agente colinomimético.

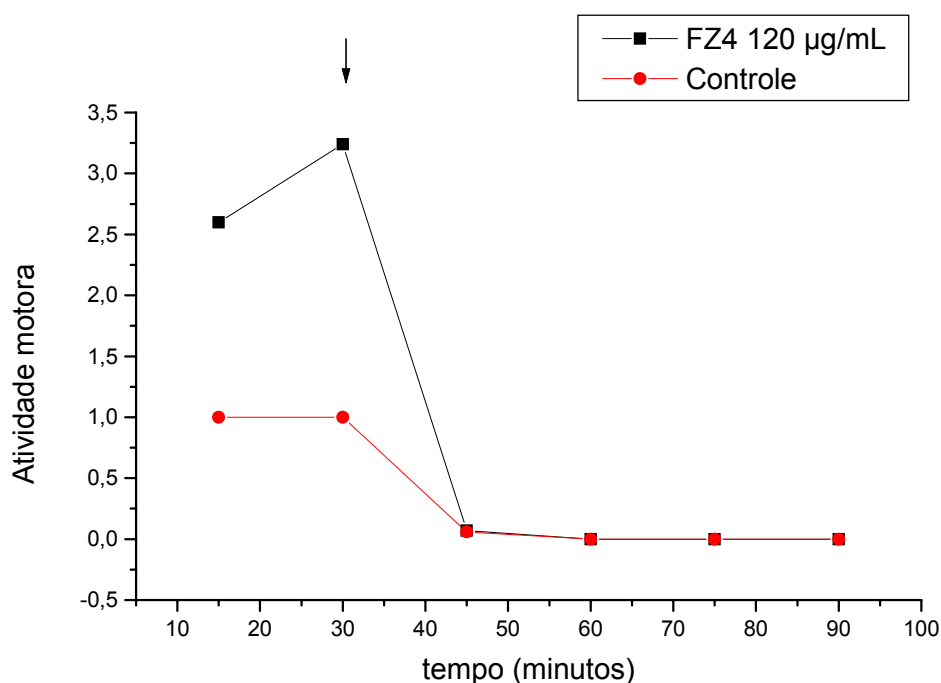


Figura 2- Efeito do FZ-4 na atividade motora e paralisia de schistosoma induzido por carbacol. FZ4 foi adicionado no tempo 0. A seta indica a adição de  $10^{-3}$ M de carbacol, incluindo o controle.

## DISCUSSÃO

O método visual *in vitro* para medida da atividade motora tem correspondência com o sistema de medida de quantificação do potencial elétrico da superfície do schistosoma. Segundo Fetterer e colaboradores (1977), a atividade elétrica da superfície do schistosoma está intimamente associada com contrações espontâneas do corpo do verme. O emprego de

um ou outro método possibilita a avaliação de agentes neurofarmacológicos e esquistossomicidas no sistema neuromuscular do *Schistosoma mansoni* (Mellin *et al.*, 1983).

O hicanone e o oxamniquine apresentam atividade anticolinérgica, promovendo aumento da motilidade de schistosomas. O carbacol, colinomimético de atuação direta sobre receptores colinérgicos pós-sinápticos, bloqueia este efeito, promovendo a paralisia do verme *in vitro* com concentração de  $10^{-4}$ M em 12 minutos. No entanto, essa propriedade anticolinérgica do hicanone e do oxamniquine não apresentou correlação com sua propriedade esquistossomicida uma vez que schistosomas resistentes a esta droga e cepas de *S. japonicum*, refratário ao seu efeito esquistossomicida, apresentaram também aumento da atividade motora (Pica-Mattocchia e Cioli, 1986).

O aumento da atividade motora de schistosomas, devido à ação da imidazolidina FZ4 foi bloqueado pelo carbacol encontrando semelhanças com as observações de Pica-Mattocchia e Cioli (1986), sugerindo ser o aumento da atividade motora mediada pelo sistema colinérgico. O padrão do comportamento peristáltico do verme induzido pela imidazolidina encontra similaridades com os relatos de Senft e Hillman (1977) quando propõem que os efeitos anticolinérgicos do hicanone contribuem para a morte do verme por promover perturbações peristálticas as quais dificultam a alimentação favorecendo a morte do parasito por desnutrição.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos colegas Prof. Dr. Mohamed Saad Lahlou e a Profª. Dra. Glória Isolina Pinto Duarte do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da Universidade Federal de Pernambuco pelo fornecimento do carbacol e pelas valiosas sugestões para execução da parte experimental deste trabalho.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barker LR, Bueding E, Timms AR. The possible role of acetylcholine in *Schistosoma mansoni*. *British Journal of Pharmacology* 26:656-665, 1966.
- Bennett JL, Bueding E, Timms AR, Engstrom RG. Occurrence and levels of 5-hydroxytryptamine in *Schistosoma mansoni*. *Molecular Pharmacology* 5:542-545, 1969.
- Duvall RH, Dewitt WB. An improved perfusion technique for recovering adult schistosomes from laboratory animals. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 16:483-486, 1967.
- Fetterer RH, Pax RA, Bennett JL. *Schistosoma mansoni*: direct methods for simultaneous recording of electrical and motor activity. *Experimental Parasitology* 43:286-294, 1977.
- Halton DW, Gustafsson MKS. Functional morphology of the platyhelminth nervous system. *Parasitology* 113:S47-S72, 1996.
- Hillman GR, Senft AW. Schistosome motility measurements: response to drugs. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 185:177-184, 1973.
- Katz N, Peixoto SV. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33:303-308, 2000.
- Lima MCA, Costa DLB, Góes AJS, Galdino SL, Pitta IR, Luu-Duc C. Synthèse et activité antimicrobienne de dérivés chlorobenzyl benzylidène imidazolidinediones et thiazolidinediones substituées. *Pharmazie* 47:182-184, 1992.
- Mellin TN, Busch RD, Wang CC, Kath G. Neuropharmacology of the parasitic trematode, *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32:83-93, 1983.

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

Pica-Mattoccia L, Cioli D. Lack of correlation between schistosomicidal and anticholinergic properties of hycanthone and related drugs. The Journal of Parasitology 72:531-539, 1986.

Senft AW, Hillman G R. Hycanthone effects on schistosomes and its likely mode of action. In H. Van den Bossche ed., Biochemistry of Parasites and Host-parasite Relationships. Elsevier, Amsterdam, p619-628, 1977.

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

---

1. Departamento de Medicina Tropical. 2. Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA). 3. Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos (LPSF). Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).

*Endereço para correspondência:* Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, s/n, CEP 50670-901 Recife, Brasil. Tel: 55 81 3271-8347, Fax: 55 81 3271-8346.

e-mail: [suelygaldino@aol.com](mailto:suelygaldino@aol.com)



## CONCLUSÕES

## 12- CONCLUSÕES

Considerando que a busca de novas moléculas para fins profiláticos ou terapêuticos representa uma das principais estratégias para controle da esquistossomose, cuja gravidade é acentuada pelos altos índices de prevalência e pela insuficiência de alternativas quimioterápicas para as populações das áreas endêmicas, os resultados obtidos neste trabalho, conduziram às seguintes conclusões:

- ✓ Entre os vários derivados imidazolidínicos estudados, foram sintetizados e devidamente comprovados as estruturas químicas de novos compostos imidazolidínicos potencialmente ativos frente ao *Schistosoma mansoni*, a saber:

**JT-17:** 5-(3-Cloro-benzilideno)-3-(4-fenil-benzil)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona

**JT-57:** 3-(4-Fenil-benzil)-5-(3-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona

**JT-62:** 3-(4-Fenil-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona

**JT-67:** 3-(4-Fenil-benzil)-5-(4-metil-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona

**JT-58:** 3-Benzil-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona

**JT-59:** 3-(4-Cloro-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona

**JT-60:** 3-(4-Bromo-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona

**JT-61:** 3-(4-Flúor-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona

- ✓ Os derivados benzilideno-imidazolidínicos estudados neste trabalho foram isolados na forma de um único isômero. Os estudos de acoplamento por espectrometria de RMN  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ , determinando o valor da constante de acoplamento entre o próton etilênico e o carbono da carbonila exocíclica em posição 4, mostraram que os compostos estudados apresentam configuração Z
- ✓ Os compostos imidazolidínicos estudados, em diferentes concentrações, provocaram consideráveis efeitos sobre a mortalidade, pareamento, atividade motora e integridade do tegumento de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* mantidos *in vitro*. Entre os compostos estudados, destacaram-se FZ-

4, JT-59 e JT-62 por garantir 100% de mortalidade dos vermes tratados ao final do período de tratamento

- ✓ As alterações ultraestruturais observadas no tegumento dos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*, após tratamento com derivados imidazolidínicos, foram consideravelmente deletérias, consistindo principalmente de erosão e descamação, enrugamento no corpo, danos na ventosa oral, diminuição no tamanho e desorganização dos tubérculos, além de descamação e formação de vesículas.
- ✓ O estímulo da atividade motora provocado pelo composto 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-nitro-benzilideno)-imidazolidin-2,4-diona (FZ-4) foi bloqueado pelo colinomimético carbacol, sugerindo uma ação direta deste composto em receptores colinérgicos
- ✓ A possibilidade de complementação e aprofundamento aos conhecimentos adquiridos, visando, sobretudo, a síntese de novos análogos estruturais imidazolidínicos, a determinação da contribuição dos grupos substituintes à atividade biológica, os estudos das relações entre estrutura química e atividade biológica para identificação do grupo farmacóforo e elucidação do mecanismo de ação a nível molecular, é de fundamental importância para dar prosseguimento a esta pesquisa.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Albuquerque, M.C.P.A., Pitta, M.G.R., Silva, P.G., Malagueño, E., Santana, J.V., Irmão, J.I., Lima, M.C.A., Galdino, S.L., Pitta, I.R. (2002) Synthesis and schistosomicidal activity of benzylidene imidazolidine compounds. Submetido a *II Fármaco*.

Andrade, A.M.C., Brandão, S.S.F., Pereira, D.T.M., Barbosa Filho, J.M., Lima, M.C.A., Galdino, S.L., Pitta, I.R., Barbe, J. (2002) Synthèse et étude structural des 2-thioimidazolidinones 1,3,5-trissubstituées. Submetido ao *Heterocyclic Communications*.

Badr, S.G.E., Pica-Mattoccia, L., Moroni, R., Angelico, M., Cioli, D. (1999) Effect of bile salts on oviposition *in vitro* by *Schistosoma mansoni*. *Parasitology Research*. 85: 421-423.

Barbosa, C.S. Esquistossomose em Pernambuco: Determinantes bio-ecológicos e sócio-culturais em comunidades de pequenos agricultores da zona da mata. 1996. Tese (Doutorado em Saúde Pública) Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro.

Barbosa, F.S., Barbosa, C.S. (1995) Determination and control of schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 87(S4): 215-220.

Barbosa, C.S., Pieri, O.S., Silva, C.B., Barbosa, F.S. (2000) Ecoepidemiologia da esquistossomose urbana na Ilha de Itamaracá, Estado de Pernambuco. *Revista de Saúde Pública*. 34: 337-341.

Barker, L.R., Bueding, T., Timms, A.R. (1966) The possible role of acetylcholine in *Schistosoma mansoni*. *British Journal of Pharmacology*. 26: 656-665.

Barth, L.R., Fernandes, A.P.M., Ribeiro-Paes, J.T., Rodrigues, V. (1996) Effects of Goyazensolide during *in vitro* cultivation of *Schistosoma mansoni*. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 92: 427-429.

Bell, A., Roberts, H.C., Chappell, L.H. (1996) The antiparasitic effects of cyclosporin A: Possible drug targets and clinical applications. General Pharmacology. 27: 963-971.

Bennett, J.L., Bueding, E. (1971) Localization of biogenic amines in *Schistosoma mansoni*. Compendium of Biochemistry and Physiology. 39A: 859-867.

Bennett, J.L., Bueding, E., Timms, A.R., Engstrom, R.G. (1969) Occurrence and level of 5-hydroxytryptamine in *Schistosoma mansoni*. Molecular Pharmacology. 5: 542-545.

Bennett, J.L., Day, T., Feng-Tao, L., Ismail, M., Farghaly, A. (1997) The development of resistance to anthelmintics: A perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. Experimental Parasitology. 87: 260-267.

Bentley, A.G., Carlisle, A.S., Phillips, S.M. (1981) Ultrastructural analysis of the cellular response to *Schistosoma mansoni*. II. Inflammatory responses in rodent skin. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 30: 815-824.

Brandão, S.S.F., Guarda, V.L., Chantegrel, J., Perrissin, M., Galdino, S.L., Thomasson, F., Souza, V.M., Lima, M.C.A., Leite, L.F.C.C., Pitta, I.R., Luu-Duc, C. (2000) Synthèse et étude structurale des arylideneimidazolidines et arylidenebenzothiazines. Bolletino Chimico Farmaceutico. 139: 54-58.

Bueding, E. (1952) Acetylcholinesterase activity of *Schistosoma mansoni*. British Journal of Pharmacology. 46: 480-487.

Bueding, E., Hawkins, J., Cha, Y.N. (1981) Antischistosomal effects of cyclosporin A. Agents Actions. 11: 380-383.

Bueding, E., Mansour, J.M. (1957) The relationship between inhibition of phosphofructokinase activity and the mode of action of trivalent organic antimonials on *Schistosoma mansoni*. British Journal of Pharmacology and Chemotherapy. 12: 159-165.

Campos, R., Moreira, A.A.B., Sette Jr., H., Chamone, D.A.F., Silva, L.C. (1976) Hycantone resistance in a human strain of *Schistosoma mansoni*. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 70: 261-262.

Capron, A., Dessaint, J.P., Capron, M., Joseph, M., Torpier, G. (1982) Effector mechanism of immunity to schistosomes and their regulation. Immunological Reviews. 61: 41-66.

Carvalho, E.M., Acioli, M.D., Branco, M.A., Costa, A.M., Cesse, E.A., Andrade, A.G., Melo, E.M. (1998) Evolution of schistosomiasis endemicity in the Zona da Mata Sul, Pernambuco state, Brazil. Epidemiology and current situation: under control or out of control? Caderno de Saúde Pública. 14: 787-95.

Catto, B.A., Tracy, J.W. and Webster, L.T. (1984) 1-Thiocarbamyl-2-imidazolidinone, a metabolite of niridazole in *S. mansoni*. Molecular and Biochemical Parasitology. 10: 111-120.

Chappell, L.H., Thomson, A.W., Barker, G.C. and Smith, S.W.G. (1987) Dosage, timing, route and administration of cyclosporin A and non-immunosuppressive derivatives of dihydrocyclosporin A and cyclosporin C against *Schistosoma mansoni* *in vivo* and *in vitro*. Antimicrobial Agents for Chemotherapy. 31: 1567-1571.

Christopherson, J.B. (1918) The successful use of antimony in bilharziosis. Administered as intravenous injections of antimonium tartaratum (tartar emetic). Lancet ii: 325-327.

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

Cioli, D. (1998) Chemotherapy of schistosomiasis: An update. *Parasitology Today*. 14: 418-421.

Cioli, D., Pica-Mattoccia, L., Archer, S. (1995) Antischistosomal drugs: past, present ... and future? *Pharmacology & Therapeutics*. 68: 35-85.

Cioli, D., Pica-Mattoccia, L., Archer, S. (1993) Drug resistance in schistosomes. *Parasitology Today*. 9: 162-168.

Cioli, D., Pica-Mattoccia, L., Moroni, R. (1992) *Schistosoma mansoni*: hycanthone/oxamniquine resistance is controlled by a single autosomal recessive gene. *Experimental Parasitology*. 75: 425-432.

Coelho, M.V. *Schistosoma mansoni*. O parasito. *In*: Sales da Cunha, A. Esquistossomose mansoni. São Paulo: Editora Sarvier, Universidade de São Paulo. 1970.

Coelho, P.M.Z., Pereira, L.H., (1991) *Schistosoma mansoni*: Preclinical studies with 9-acridanone-hydrazones in Cebus monkeys experimentally infected. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 33(1): 50-57.

Coelho, P.M.Z., Tavares, C.A.P. Diagnóstico Imunológico. *In* L.P. Castro, P.R.S. Rocha and A.S. Cunha. Tópicos em Gastroenterologia 2. Rio de Janeiro: Editora Medsi, 1991.

Cohen, C., Reinhardt, B., Castellani, L., Norton, P., Stirewalt, M. (1982) *Schistosoma* surface spines are 'crystals of actin'. *Journal of Cell Biology*. 95: 987-988.

Coles, G.C. (1984) Recent advances in schistosome biochemistry. *Parasitology*. 89: 603-637.

Coles, G.C., Mutahi, W.T., Kinoti, G.K., Bruce, J.I., Katz, N. (1987) Tolerance of Kenyan *Schistosoma mansoni* to oxamniquine. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 81: 782-785.

Costa, D.L.B., Chantegrel, J., Lima, M.C.A., Albuquerque, J.F.C., Lima, R.M.O.C, Galdino, S.L., Pitta, I.R., Luu-Duc, C. (1995) Synthèse et structure des 5-arylidène imidazolidine-2,4-diones et thiazolidine-2,4-diones 3-substituées. *Journal de Pharmacie de Belgique* 50:5-10.

Dewar, M.J.S., Thiel, W. (1977) *Journal of American Chemical Society*. 99: 4899.  
*In*: Karelson, M., Lobanov, V., Katritzky, A.R. (1996) Quantum chemical descriptors in QSAR/QSPR studies. *Chemical Reviews*. 96: 1027-1043.

Dobbs, K.D., Hehre, W.J. (1987) Molecular orbital theory of the properties of inorganic and organometallic compounds . 6. Extended basis sets for 2nd -row transition metals. *Journal of Computational Chemistry*. 8: 880-893.

Doenhoff, M.J., Sabah, A.A.A., Fletcher, C., Webbe, G., Bain, J. (1987) Evidence for an immune-dependent action of praziquantel on *Schistosoma mansoni* in mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 81: 947-951.

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

Fallon, P.G., Cooper, R.O., Probert, A.J., Doenhoff, M.J. (1992) Immune-dependent chemotherapy of schistosomiasis. *Parasitology*. 105: S41-48.

Fetterer, R.H., Pax, R.A., Bennett, J.T. (1977) *Schistosoma mansoni*: Direct method for simultaneous recording of electrical and motor activity. *Experimental Parasitology*. 43: 286-294.

Galdino, S.L., Lima, M.C.A., Góes, A.J.S., Pitta, I.R., Luu-Duc, C. (1991 A) Spectrometrie de masse des benzylidene imidazolidinediones et thiazolidinediones. II- Derives chlorobenzyl imidazolidinediones et fluoro ou chlorobenzyl thiazolidinediones. *Spectroscopy Letters*. 24: 1013-1021.

Galdino, S.L., Góes, A.J.S., Lima, M.C.A., Pitta, I.R., Luu-Duc, C. (1991 B) Spectrometrie de masse des benzylidene thiazolidinediones et imidazolidinediones. I- Derives fluorobenzyl thiazolidinediones et benzyl imidazolidinediones. *Spectroscopy*. 9: 87-91.

Galdino, S.L., Pitta, I.R., Menezes, E.H.C., Amorim, E.L.C., Brandão, S.S.F., Luu-Duc, C. (1992) Mass spectrometry of some benzylidene imidazolidinediones and thiazolidinediones. IV- Benzyl and bromobenzyl imidazolidinedione and nitrobenzyl thiazolidinedione compounds. *Spectroscopy*. 10: 9-15.

Góes, A.J.S., Lima, M.C.A., Galdino, S.L., Pitta, I.R., Luu-Duc, C. (1991 A) Synthèse et activité, antifongique des chlorobenzyl benzylidène thiazolidinediones et imidazolidinediones substituées. *Annales Pharmaceutiques Françaises*. 49(2): 92-98.

Góes, A.J.S., Lima, M.C.A., Galdino, S.L., Pitta, I.R., Luu-Duc, C. (1991 B) Synthèse et activité, antimicrobienne des fluorobenzyl benzylidène thiazolidinediones et imidazolidinediones substituées. *Journal Pharmaceutique de Belgique*. 46(4): 236-240.

Guissé, F., Polman, K., Stelma, F.F. (1997) Therapeutic evaluation of two different dose regimens of praziquantel in a recent *S. mansoni* focus in Northern Senegal. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 56: 511-514.

Gringauz, A. Introduction to Medicinal Chemistry - Drugs: How Drugs Act and Why. New York, Willey-VCH, 1997.

Groll, E. (1984) Praziquantel. Advances in Pharmacology and Chemotherapy. 20:219-238.

Halton, D.W., Gustafsson, M.K.S. (1996) Functional morphology of the platyhelminth nervous system. Parasitology. 113: 47-72.

Hillman, G.R., Gibler, W.B. (1975) Acetylcholine receptors in *Schistosoma mansoni*: visualization and blockade by hycanthone. Biochemical Pharmacology. 24: 1911-1914.

Hillman, G.R., Senft, A.W. (1973) Schistosome motility measurements: Response to drugs. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 185: 177-184.

Hillman, G.R., Senft, W.A. (1975) Anticholinergic properties of the antischistosomal drug hycanthone. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 24: 827-834.

Hillman, G.R., Senft, A.W., Gibler, W.B. (1978) The mode of action of hycanthone revisited. The Journal of Parasitology . 64: 754-756.

Hoffman, W.A., Pons, J.A., Janer, J.L. (1934) Sedimentation concentration method in schistosomiasis mansoni. Puerto Rico Journal of Public Health and Tropical Medicine. 9: 283-298.

Hofer, W. (1981) Chemistry of metrifonate and dichlorvos. Acta Pharmacologica et Toxicologica. 49 S(V): 7-14.

Ismail, M., Botros, S., Metwally, A., William, S., Farghally, A., Tao, L.F., Day, T.A. Bennett, J.L. (1999) Resistance to praziquantel: Direct evidence from *Schistosoma*

*mansoni* isolated from egyptian villagers. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 60: 932-935.

Katz, N., Dias, E.P., Araújo, N., Souza, C.P. (1973) Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 7: 381-387.

Katz, N., Chaves, A., Pellegrino, J. (1972) A simple device for quantitative stool thick-smear technique in schistosomiasis mansoni. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 14: 397-400.

Katz, N., Peixoto, S.V. (2000) Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. Revista da Sociedade de Medicina Tropical. 33: 303-308.

Katz, N., Pellegrino, J. (1973) Estudos de alguns aspectos da esquistossomose mansoni em macacos Cebus pelo método quantitativo. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 16: 245-252.

Katz, N., Pellegrino, J., Pompeu-Memória, J.M. (1966) Quantitative oogram method in Cebus monkeys experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. The Journal of Parasitology. 52: 917-919.

Khattab, A., Pica-Mattoccia, L., Klinkert, M.Q., Wenger, R., Cioli, D. (1998) Cyclosporins: Lack of correlation between antischistosomal properties and inhibition of cyclophilin isomerase activity. Experimental Parasitology. 90: 103-109.

Köhler, P. (2001) The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. International Journal for Parasitology. 31: 336-345.

Kikuth, W., Gönnert, R. (1948) Experimental studies on the therapy of schistosomiasis. Annals of Tropical Medicine and Parasitology. 42: 256-267.



Lambert, C.R. (1964) Chemotherapy of experimental *Schistosoma mansoni* infection with a nitro-thiazole derivative CIBA 32,644-BA. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 58: 292-303.

Levine, I.N. *Quantum Chemistry*, 4ª edição, New Jersey: Prentice Hall, 1991.

Liang, Y.S., Coles, G.C., Doenhoff, M.J., Southgate, V.R. (2001) *In vitro* responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *International Journal for Parasitology*. 31: 1227-1235.

Lima, M.C.A., Costa, D.L.B., Goes, A.J.S., Galdino, S.L., Pitta, I.R., Luu-Duc, C. (1992) Synthèse et activité antimicrobienne de dérivés chlorobenzyl benzylidène imidazolidinediones et thiazolidinediones substituées. *Pharmazie*. 47(3): 182-184.

Malagueño, E., Santana, J.V. Etiologia da esquistossomose. *In: Malta J. Esquistossomose mansônica*. Recife. Editora Universitária. 1994.

McLaren, D.J., Hockley, D.J. (1977) Blood flukes have a double membrane. *Nature*. 269: 147-149.

Mellin, T.N., Busch, R.D., Wang, C.C., Kath, G. (1983) Neuropharmacology of the parasitic trematode, *Schistosoma mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 32: 83-93.

Menezes, E.H.C., Góes, A.J.S., Diu, M.B.S., Galdino, S.L., Pitta, I.R., Luu-Duc, C. (1992) Synthesis and structure of substituted benzyl imidazolidinedione and chlorobenzyl thiazolidinedione compounds. *Pharmazie*. 47: 457-458.

Miller, F.H., Tulloch Jr., G.S., Kuntz, R.E. (1972) Scanning electron microscopy of integumental surface of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*. 58: 693-698.

Neame, K.D., Homewood, C.A., Marschall, I., Jewsbury, J.M. (1978) The effect of hycanthone on nucleic acid synthesis by *Schistosoma mansoni*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*. 72: 587-588.

Nordgren, I., Holmstedt, B., Bengtsson, E., Finkel, Y. (1980) Plasma levels of metrifonate and dichlorvos during treatment of schistosomiasis with Bilarcil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 29: 426-430.

Oliveira, S.M. Síntese, avaliação biológica e modelagem molecular de imidazolidinas bioisósteras. 2002 Tese (Mestrado em Biotecnologia de Produtos Bioativos) Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Oliver, L., Stirewalt, M.A. (1952) An efficient method for exposure of mice to cercariae of *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*. 38: 19-23.

Patrick, G.L. *An Introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, Oxford, 1997.

Pellegrino, J., Faria, J. (1965) The oograma method for the screening of drugs in *S. mansoni*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 14: 363-369.

Penido, M.L.O., Nelson, D.L., Vieira, L.Q., Coelho, P.M. (1994) Schistosomicidal activity of alkylaminooctanethiosulphuric acids. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 89: 595-602.

Pereira, L.H., *Schistosoma mansoni*. In: Neves, D.P., Melo, A.L., Genaro, O., Linardi, P.M. *Parasitologia Humana*. 10ª ed. São Paulo: Atheneu., 2000.

Pessôa, S.B., Martins A.V. *Pessôa Parasitologia Médica* 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogam S.A. 1977.

Pica-Mattoccia, L., Cioli, D. (1983) Effect of hycanthonne administered *in vivo* upon the incorporation of radioactive precursors into macromolecules of *Schistosoma mansoni*. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 8: 99-107.

Pica-Mattoccia, L., Cioli, D. (1986) Lack of correlation between schistosomicidal and anticholinergic properties of hycanthonne and related drugs. *The Journal of Parasitology*. 72: 531-539.

Pitta, I.R., Bosso, C., Góes, A.J.S., Lima, M.C.A., Galdino, S.L., Luu-Duc, C. (1992) Mass spectrometry of some benzylidene imidazolidinediones and thiazolidinediones. III- Positive and negative electron impact mass spectra of chlorobenzyl imidazolidinedione or thiazolidinedione compounds. *Spectroscopy Letters*. 25: 419-431.

Popiel, I. (1986) The reproductive biology of schistosomes. *Parasitology Today*. 2: 10-15.

Prata, A. Esquistossomose mansoni. *In: Veronesi Tratado de Infectologia*. São Paulo: Editora Atheneu. 1996.

Rabello, A. (1997) Diagnosing schistosomiasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 92: 669-676.

Richards, H.C., Foster, R. (1969) A new series of 2-aminomethyl-tetrahydroquinoline derivatives displaying schistosomicidal activity in rodents and primates. *Nature*. 222: 581-582.

Rey, L. *Parasitologia* 3ªed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A. 2001.

Rosi, D., Peruzzotti, G., Dennis, E.W., Berberian, D.A., Freele, H., Archer, S. (1965) A new active metabolite of Miracil D. *Nature*. 208:1005-1006.

Rogers, S.H., Bueding, E. (1971) Hycanthonne resistance: development *in S. mansoni*. *Science* 172: 1057-1058.

Savioli, L., Renganathan, E., Montresor, A., Davis, A., Behbehani, K. (1997) Control of schistosomiasis – A global picture. *Parasitology Today*. 13: 444-448.

Schmidt, G.D., Roberts, L.S. *Foundations of Parasitology*. 4<sup>th</sup> ed. USA: Times Mirror/Mosby College Publishing, 1989.

Senft, A.W., Hillman, G.R. (1973) Effect of hycanthone, niridazole and antimony tartrate on schistosome motility. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 22: 734-742.

Seubert, J., Pohlke, R., Loebich, F. (1977) Synthesis and properties of praziquantel, a novel broad spectrum anthelmintic with excellent activity against schistosomes and cestodes. *Experientia*. 33: 1036-1037.

Simone, C.A., Pereira, M.A., Luu-Duc, C., Pitta, I.R., Galdino, S.L., Menezes E.H.C., Zukerman-Schpector, J. (1996) 3-Benzyl-5-(2-fluorobenzylidene)-imidazolidine-2,4-dione. *Acta Crystallographica*. C52: 2771-2772.

Standen, D. (1952) The effect of temperature light and salinity upon the hatching of the ova of *Schistosoma mansoni*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 45: 225-241.

Stelma, F.F., Sall, S., Daff, B., Sow, S. (1997) Oxamniquine cures *Schistosoma mansoni* infection in a focus in which cure rates with praziquantel are unusually low. *Journal of Infectious Diseases*. 176: 304-307.

Stelma, F.F., Talla, I. Sow, S. (1995) Efficacy and side effects of praziquantel in an epidemic focus of *Schistosoma mansoni*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 53: 167-170.

Stohler, H.R., Moutavon, M. (1984) 9-Acridanone-hidrazones, a novel class of broad-spectrum schistosomicidal agents. In: XI International Congress for Tropical Medicine and Malaria, Calgary, Canadá, 16-22 September, p.148.

Sturrock, R.F. (1989) The control of schistosomiasis: epidemiological aspects of reinfection. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 84: 134-148.

TanaKa, H., Tsuji, M. (1997) From discovery to eradication of schistosomiasis in Japan: 1847-1996. International Journal for Parasitology. 27: 1465-1480.

TDR - Special Program for Research and Training in Tropical Diseases.  
<http://www.who.int.tdr.diseases/schisto/default.htm>

Thompson, D.P., Pax, R.A., Bennett, J.L. (1982) Microelectrode studies of the tegument and subtegumental compartments of the male *Schistosoma mansoni*: an analysis of electrophysiological properties. Parasitology. 85:163-178.

Tracy, J.W., Fairchild, E.H., Lucas, S.V., Webster, L.T. (1980) Isolation, characterization and synthesis of an immunoregulatory metabolite of niridazole: 1-thiocarbamyl-2-imidazolidinone. Molecular Pharmacology. 18: 313-319.

Tracy, J.W., Catto, B.A., Webster, L.T. (1983) Reductive metabolism of niridazole by adult *Schistosoma mansoni*. Correlation with covalent drug binding to parasite macromolecules. Molecular Pharmacology. 24: 291-299.

Urman, H.K., Bulay, O., Clayson, D.B., Shubik, P. (1975) Carcinogenic effects of niridazole. Cancer Letters. 1: 69-74.

Utzinger, J., N'Goran, E.K., N'Dri, A., Lengeler, C., Shuhua. X., Tanner, M. (2000) Oral artemether for prevention of *Schistosoma mansoni* infection: randomised controlled trial. Lancet 355: 1320-1325.

Ximenes, R.A.A., Southgate, B., Smith, P.G., Guimarães Neto, I. (2000) Migration and urban schistosomiasis. The case of São Lourenço da Mata, Northeast of Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 42: 209-217.

Webster Jr., L.T., Butterworth, A.E., Mahmoud, A.A.F., Mingola, E.N., Warren, K.W. (1975) Suppression of delayed hypersensitivity in schistosome-infected patients by niridazole. *New England Journal of Medicine*. 292: 1144-1147.

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

WHO - Drug Information (1999) *Essential Drugs*. 13(4): 249-262.

Xiao, S.H., Friedman, P.A., Catto, B.A., Webster, L.T. (1984) Praziquantel-induced vesicle formation in tegument of male *Schistosoma mansoni* is calcium dependent. *The Journal of Parasitology*. 70: 177-179.

Zhou, Y., Podesta, R.B. (1989) Effects of serotonin (5HT) and complement C<sub>3</sub> on the synthesis of the surface membrane precursors of adult *Schistosoma mansoni*. *The Journal of Parasitology*. 75: 333-343.



# ANEXOS

## 14- ANEXOS

### Anexo 1: Síntese dos derivados 2-tioxo-imidazolidin-4-onas

A síntese dos derivados imidazolidínicos foi realizada mediante a preparação inicial da 1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **HT-1** (Brandão *et al.*, 2000), seguida da condensação tipo Knoevenagel com os benzaldeídos. Esta condensação conduziu aos derivados 5-(3-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **HT-12**, 5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **HT-13** e 5-(4-metil-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **HT-14**. Por sua vez, a substituição em posição 3 dos derivados benzilideno-imidazolidínicos foi realizada pela utilização do 4-bromo-metil-bifenil em presença de hidróxido de potássio. As respectivas estruturas químicas foram devidamente comprovadas por espectrometria de massas, espectroscopia de infravermelho e de ressonância magnética nuclear de hidrogênio.

Os procedimentos gerais de síntese e as propriedades estruturais para esses compostos estão descritas a seguir:

#### **1-Metil-2-tioxo-5-benzilideno-imidazolidin-4-onas**

Uma mistura de 1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona **HT-1** (1,3g; 0,01mol), 0,012mol do aldeído, 2,5g de acetato de sódio fundido e 10mL de ácido acético foi aquecida a refluxo durante 3 horas. Após resfriamento, o produto precipitado foi lavado com ácido acético e água.

#### **1-Metil-2-tioxo-3-benzil-5-benzilideno-imidazolidin-4-onas**

Em um balão de 25mL foi adicionado 1-metil-2-tioxo-5-benzilideno-imidazolidin-4-ona (0,002mol) dissolvido em 2mL de metanol e em seguida, sob agitação magnética, uma solução de (0,12g, 0,0022mol) de KOH em 3mL de metanol foi adicionada. Após 30 minutos de contato, 0,0025mol de 4-bromo-metil-bifenil foi adicionado à temperatura ambiente e a agitação foi mantida por 24 horas. O precipitado formado foi isolado por filtração, lavado com água e depois com éter etílico. Os compostos 1-metil-2-tioxo-3-



benzil-5-benzilideno-imidazolidin-4-onas obtidos nesta reação apresentaram, após lavagem, grau de pureza suficiente para realização das análises.

As características estruturais, assim como os deslocamentos químicos apresentados no RMN<sup>1</sup>H ( $\delta$  ppm) dos derivados benzilideno imidazolidínicos em DMSO-d<sub>6</sub> 200MHz, encontram-se nas Tabelas 01 e 02, respectivamente.

Tabela 01- Características estruturais e propriedades dos derivados benzilideno imidazolidínicos

Composto	Fórmula molecular	P.F.(°C)	Rf	R%	IR (vcm <sup>-1</sup> KBr)		Massa (m/z)	
					C=O	C=C	M+(%)	(100%)
<b>HT-12</b>	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> FN <sub>2</sub> OS	186-8	0,7	41	1715	1620	236(58,5)	235
<b>HT-13</b>	C <sub>11</sub> H <sub>9</sub> FN <sub>2</sub> OS	222-4	0,7	57	1730	1630	236(68,1)	235
<b>HT-14</b>	C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	178-80	0,79	61	1735	1625	248(100)	248
<b>JT-57</b>	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> FN <sub>2</sub> OS	158-60	0,93	66	1685	1615	402(85,3)	165
<b>JT-62</b>	C <sub>24</sub> H <sub>19</sub> FN <sub>2</sub> OS	181-3	0,84	61	1685	1620	402(84,2)	237
<b>JT-67</b>	C <sub>25</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> OS	182-4	0,92	69	1685	1615	398(20,5)	165

\* Eluente CCM: clorofórmio:metanol (96:4)

Tabela 02: Deslocamentos químicos no RMN<sup>1</sup>H ( $\delta$  ppm) dos benzilideno imidazolidínicos no DMSO-d<sub>6</sub>-200MHz

Composto	NCH <sub>3</sub>		CH <sub>3</sub>		CH <sub>2</sub>		=CH-		NH		Hidrogênios aromáticos	
	s	s	s	s	s	s	s	s	s	s	R-benzilideno	R1-benzil
<b>HT 12</b>	3,46	-	-	-	-	-	-	6,74	12,44	7,20(1H,m)	7,44(1H,m)	
<b>HT 13</b>	3,45	-	-	-	-	-	6,73	12,37	7,75(1H,m)	8,07(1H,m)		
<b>HT 14</b>	3,46	2,32	-	-	-	-	6,69	12,27	7,22(2H,m)	8,12(2H,m)		
<b>JT 57</b>	3,23	-	4,51	-	-	-	6,79	-	7,20(2H,d)J=8Hz	7,97(2H,d)J=8,1Hz		
<b>JT 62</b>	3,22	-	4,49	-	-	-	6,80	-	8,33(1H,m)	7,85(1H,m)	7,63(1Hm)	7,35(10H,m)
<b>JT 67*</b>	3,11	2,37	4,60	-	-	-	6,35	-	8,31(2H,m)	7,62(1H,m)	7,42(7H,m)	7,24(3H,m)
									7,20(2H,d)J=8,1Hz	7,65(1H,m)	7,36(8H,m)	
										8,08(2H,d)J=8,1Hz		

A multiplicidade dos sinais é indicada por s=singlete, d=dublete e m=multiplete (constante de acoplamento J=Hz).

\* Espectro realizado no CDCl<sub>3</sub> 200 MHz

## Anexo 2

### Espectros de identificação dos derivados 2-tioxi-imidazolidin-4-onas

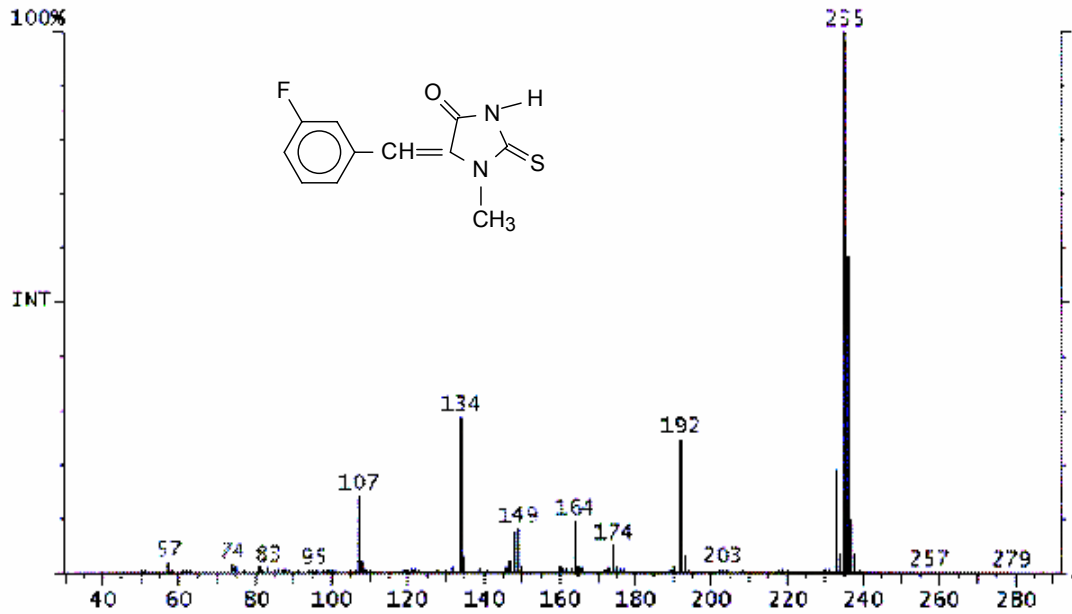


Figura 05: Espectro de massa da 5-(3-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona **HT-12**

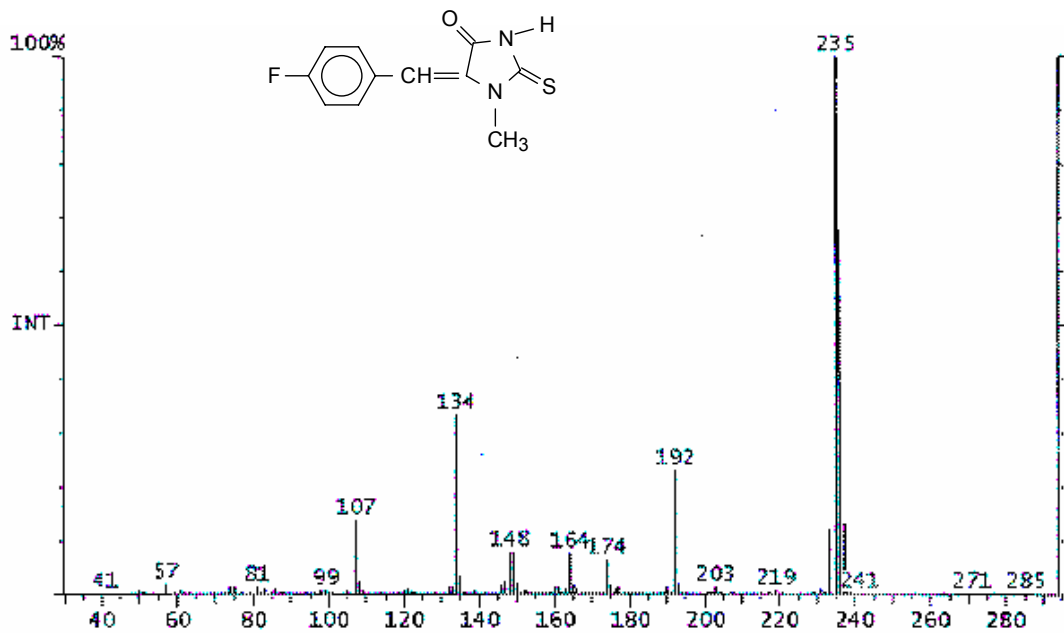


Figura 06: Espectro de massa da 5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona **HT-13**

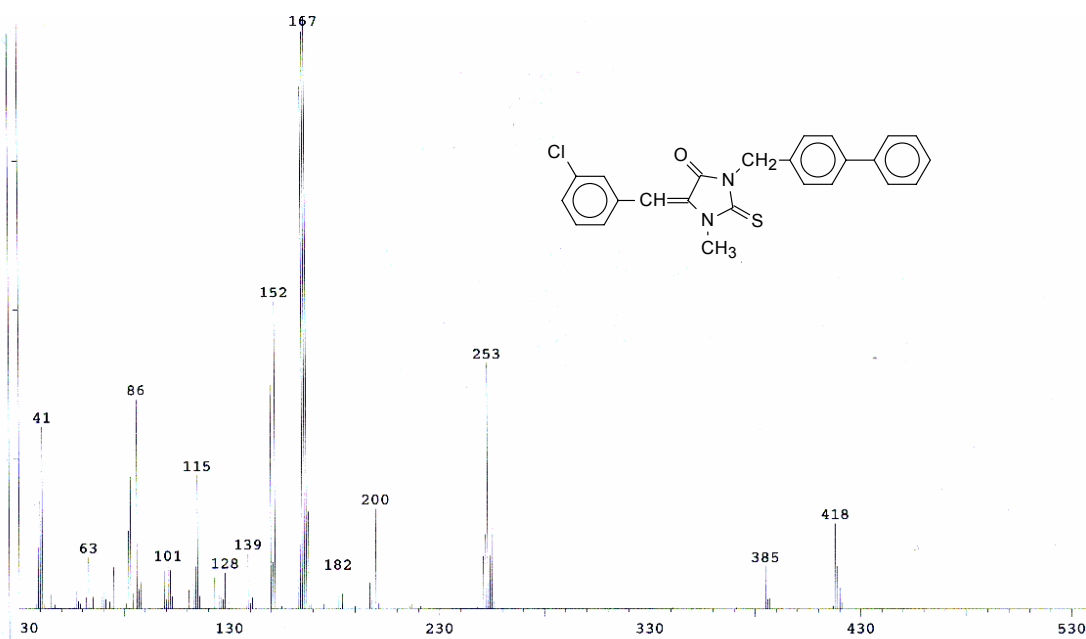


Figura 07: Espectro de massa da 5-(3-Cloro-benzilideno)-3-(4-fenil-benzil)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona **JT-17**

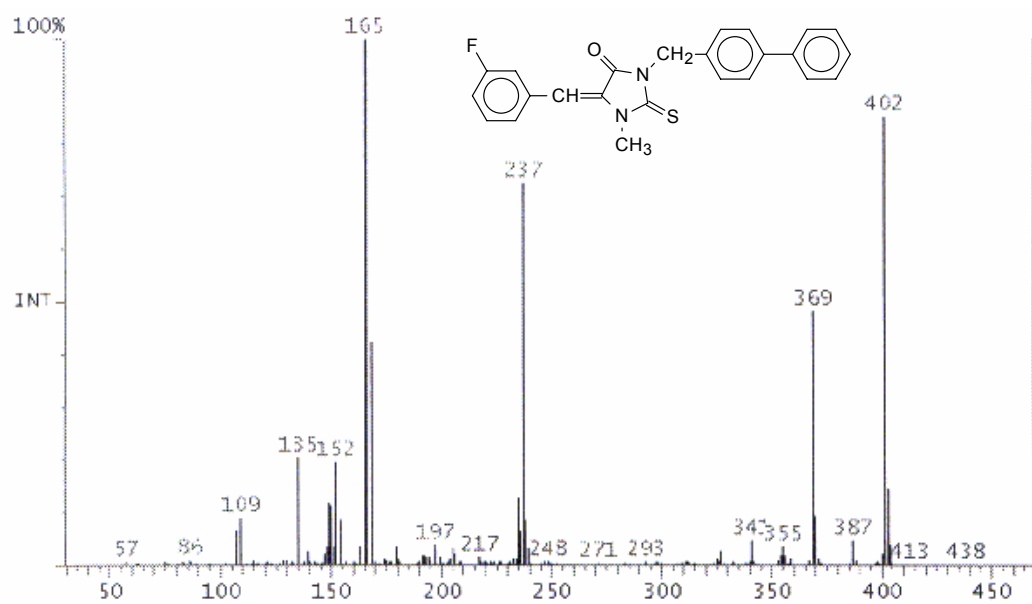


Figura 08: Espectro de massa da 3-(4-fenil-benzil)-5-(3-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona **JT-57**

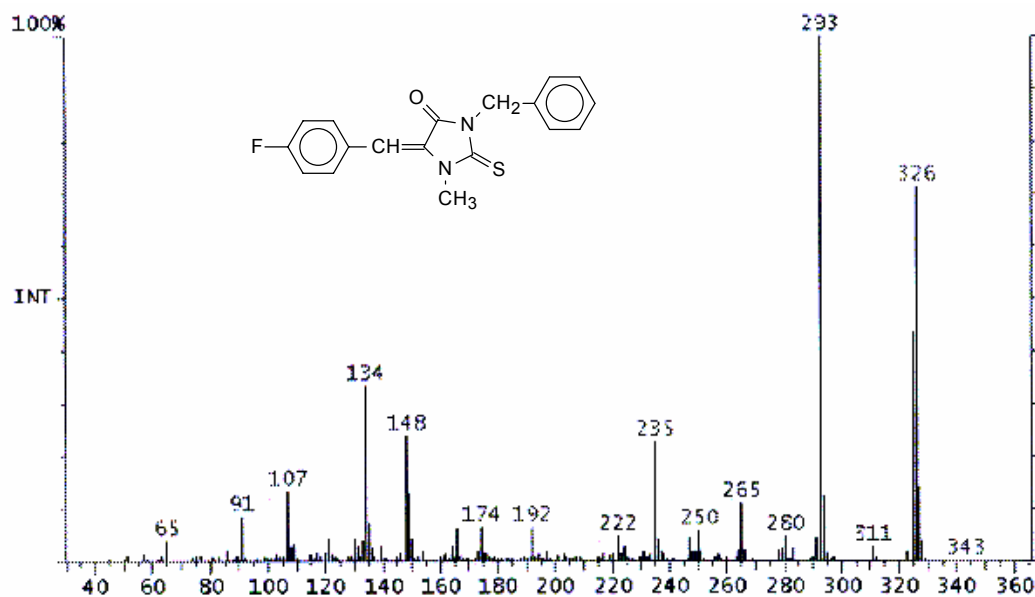


Figura 09: Espectro de massa da 3-benzil-5-(4-fluor-benzilideno)-1-metil-2-tioxiimidazolidin-4-ona **JT-58**

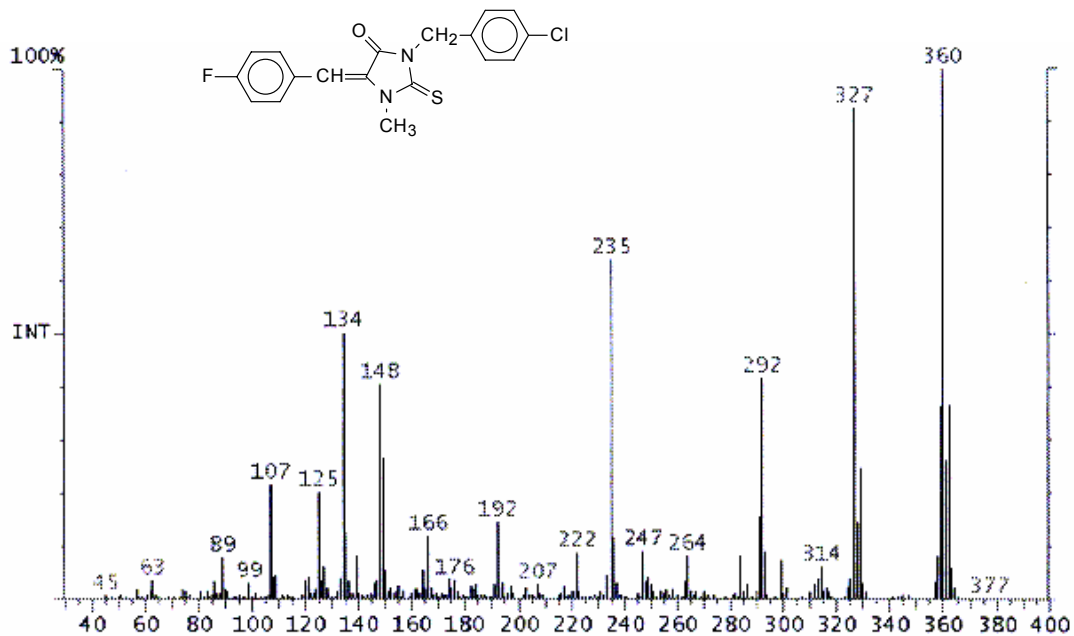


Figura 10: Espectro de massa da 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-fluor-benzilideno)-1-metil-2-tioxiimidazolidin-4-ona **JT-59**

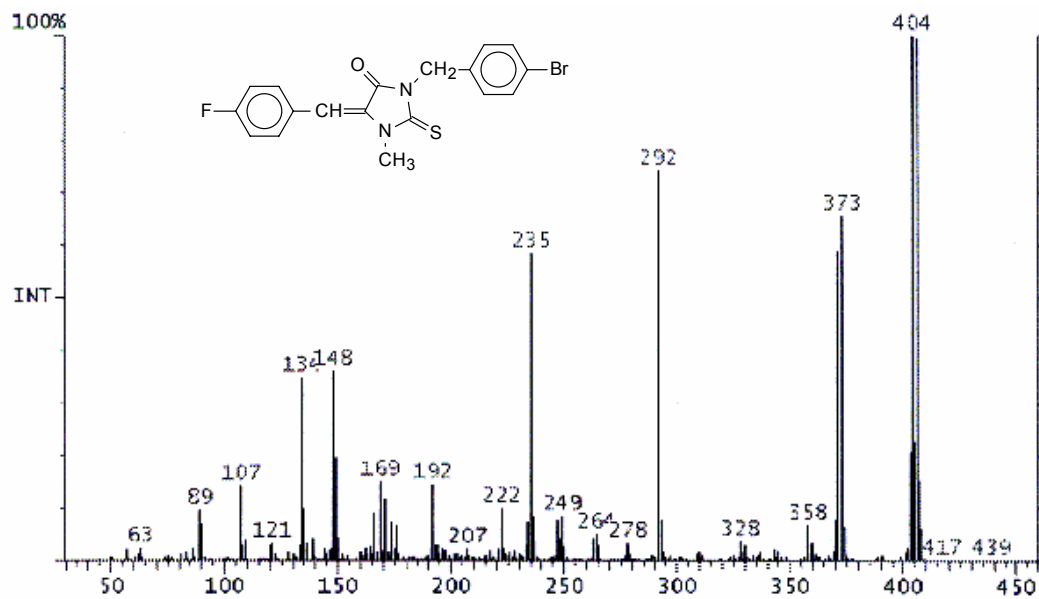


Figura 11: Espectro de massa da 3-(4-bromo-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona **JT-60**

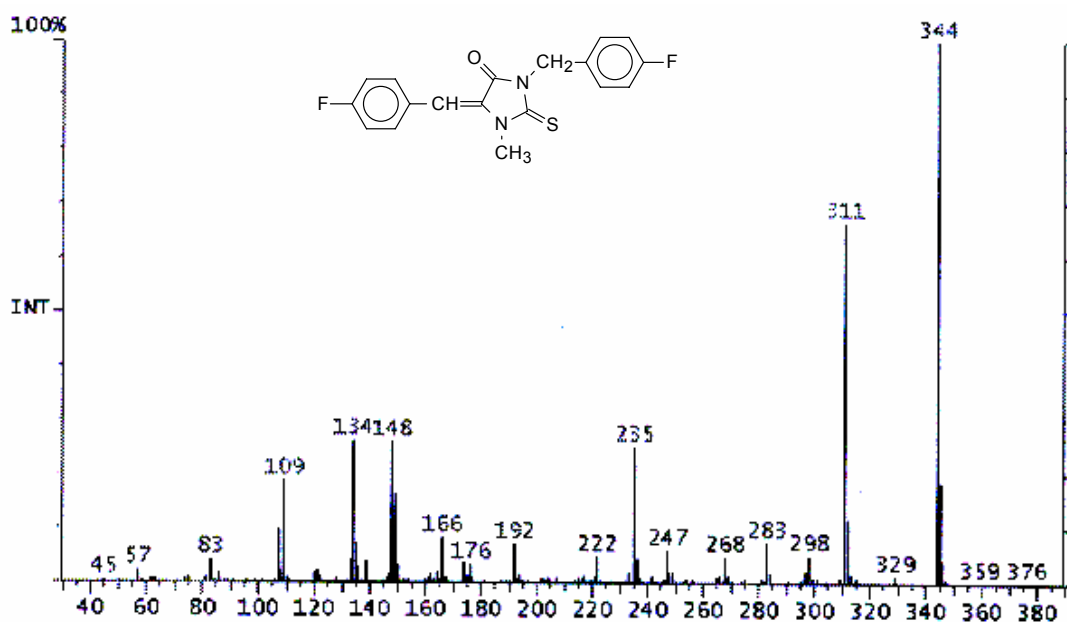


Figura 12: Espectro de massa da 3-(4-flúor-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona **JT-61**

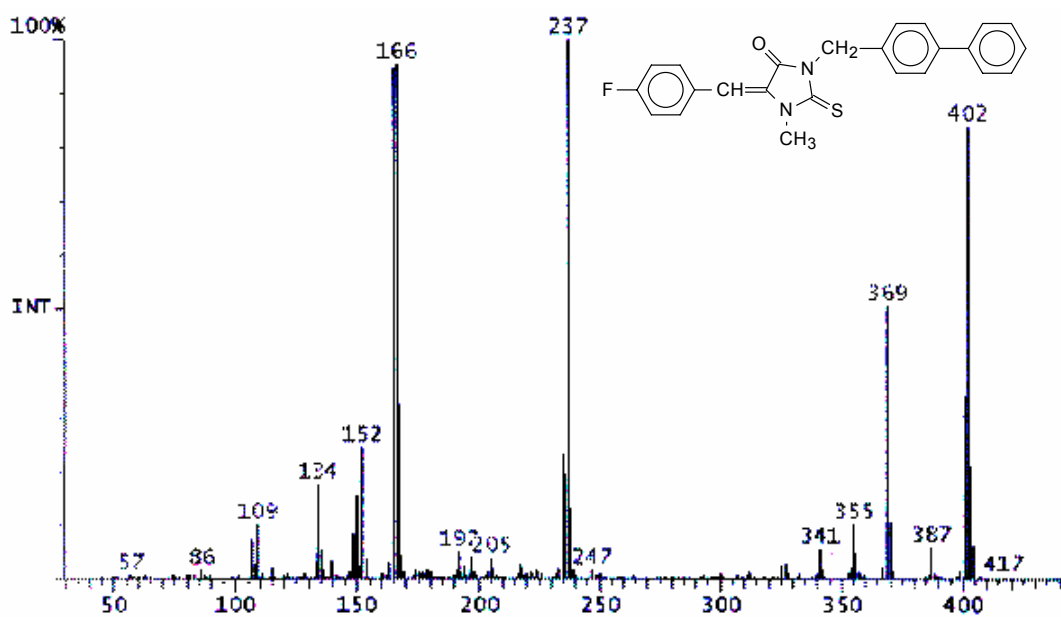


Figura 13: Espectro de massa da 3-(4-fenil-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona JT-62

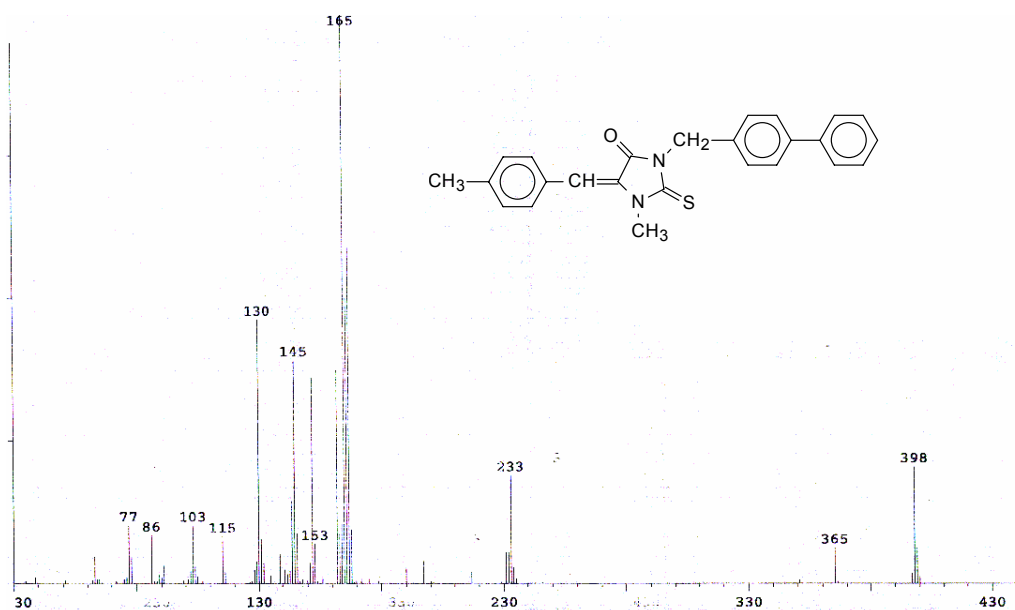


Figura 14: Espectro de massa da 3-(4-fenil-benzil)-5-(4-metil-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona JT-67



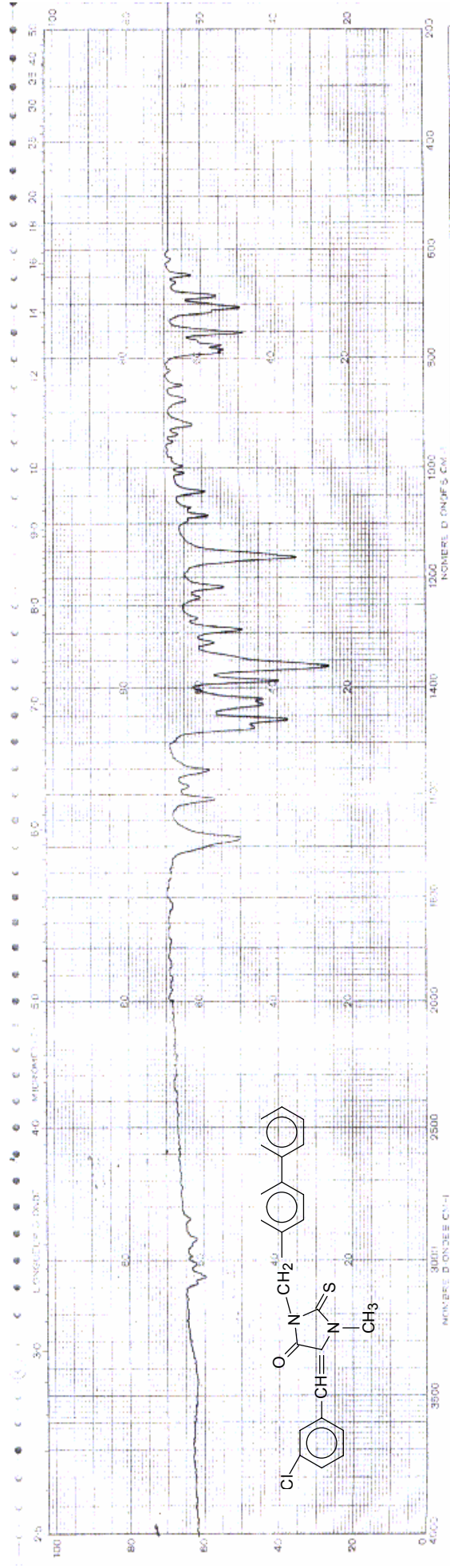


Figura 15: Espectro de infravermelho da 5-(3-cloro-benzilideno)-3-(4-fenil-benzil)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona JT-17

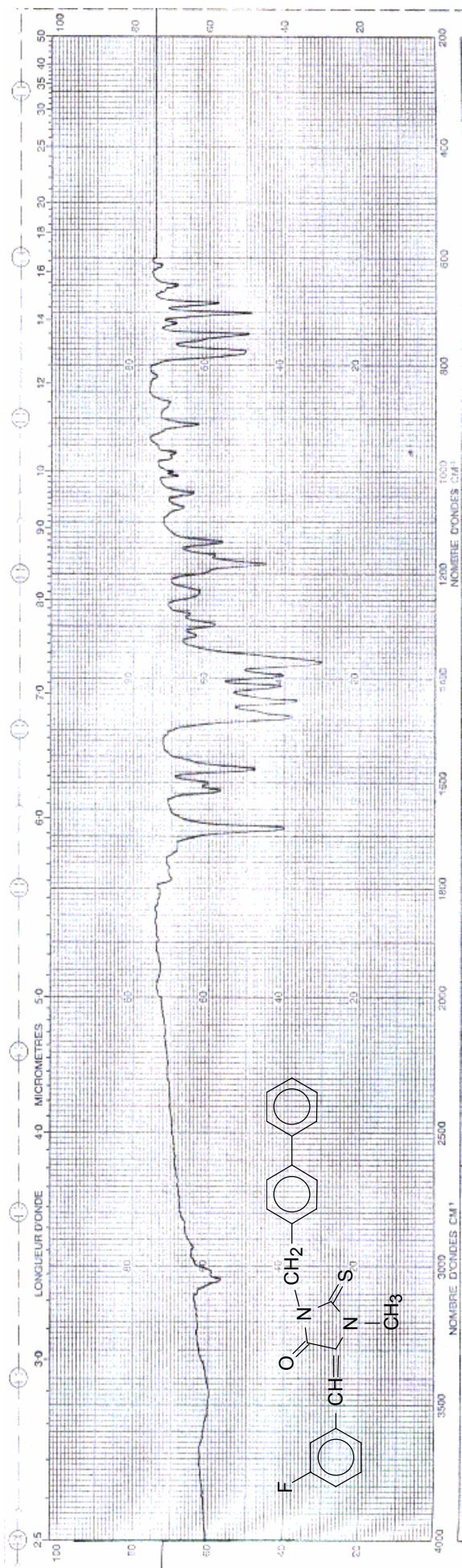


Figura 16: Espectro de infravermelho da 3-(4-fenil-benzil)-5-(3-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona JT-57

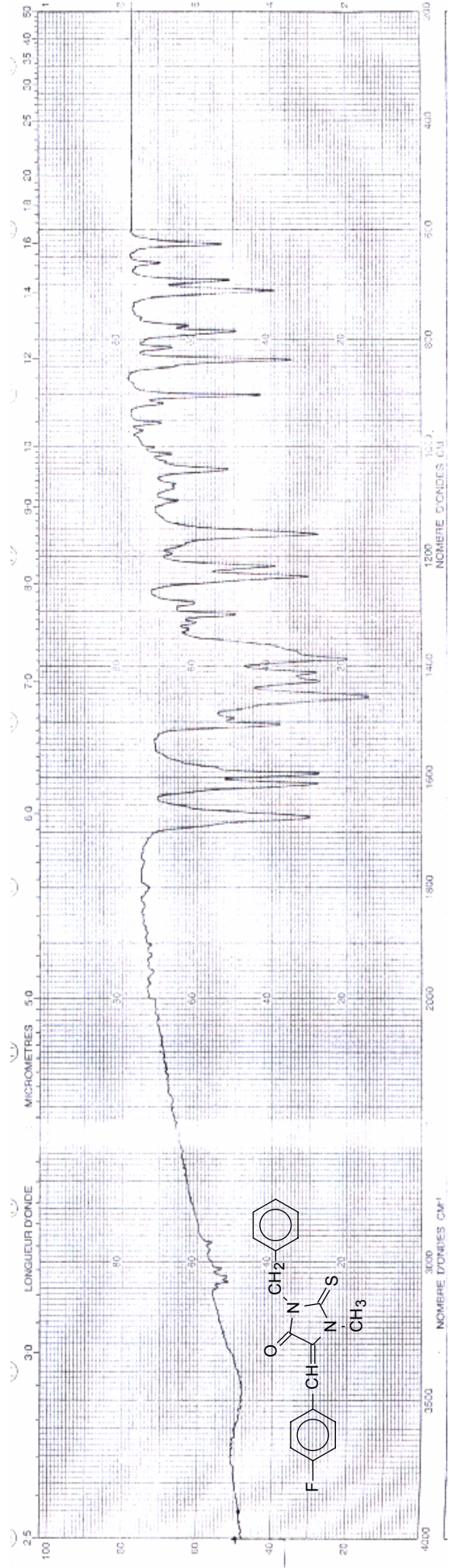


Figura 17: Espectro infravermelho da 3-benzil-5-(4-fluor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolizin-4-ona JT-58

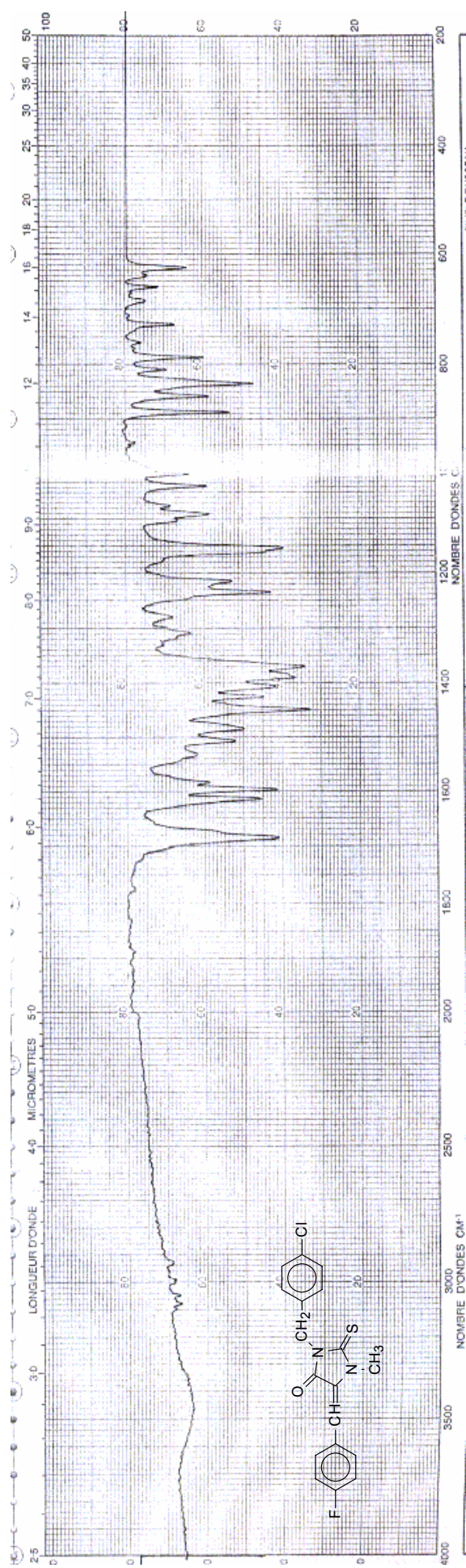


Figura 18: Espectro de infravermelho da 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-fluor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona JT-59

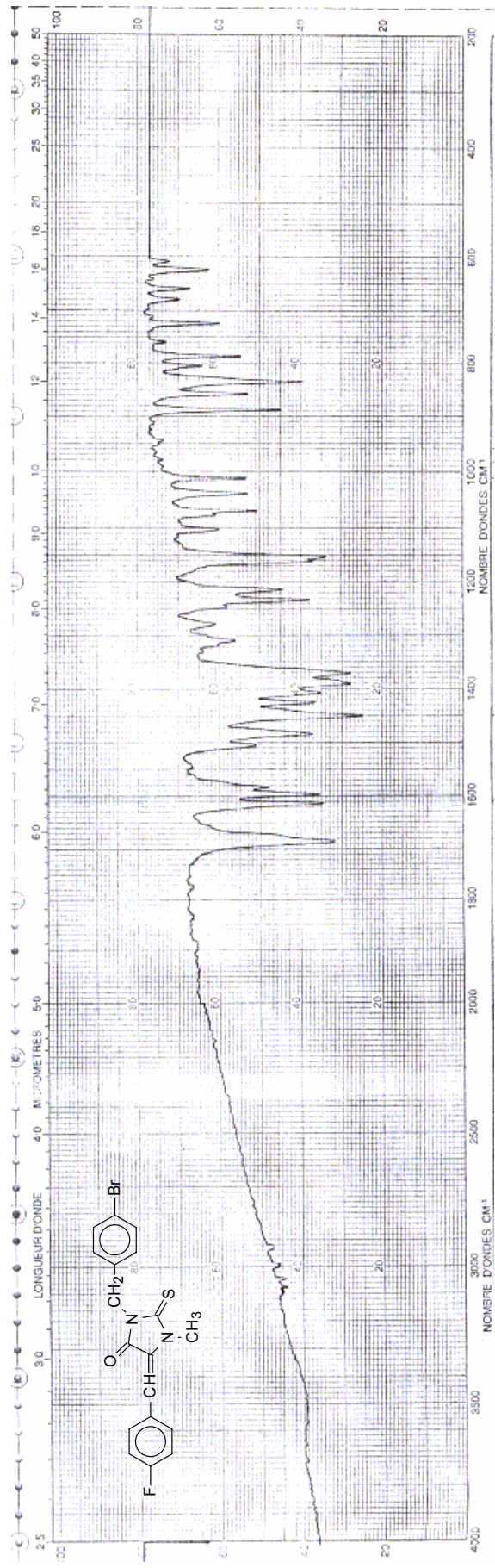


Figura 19: Espectro de infravermelho da 3-(4-bromo-benzil)-5-(4-fluor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazoliciin-4-ona JT60

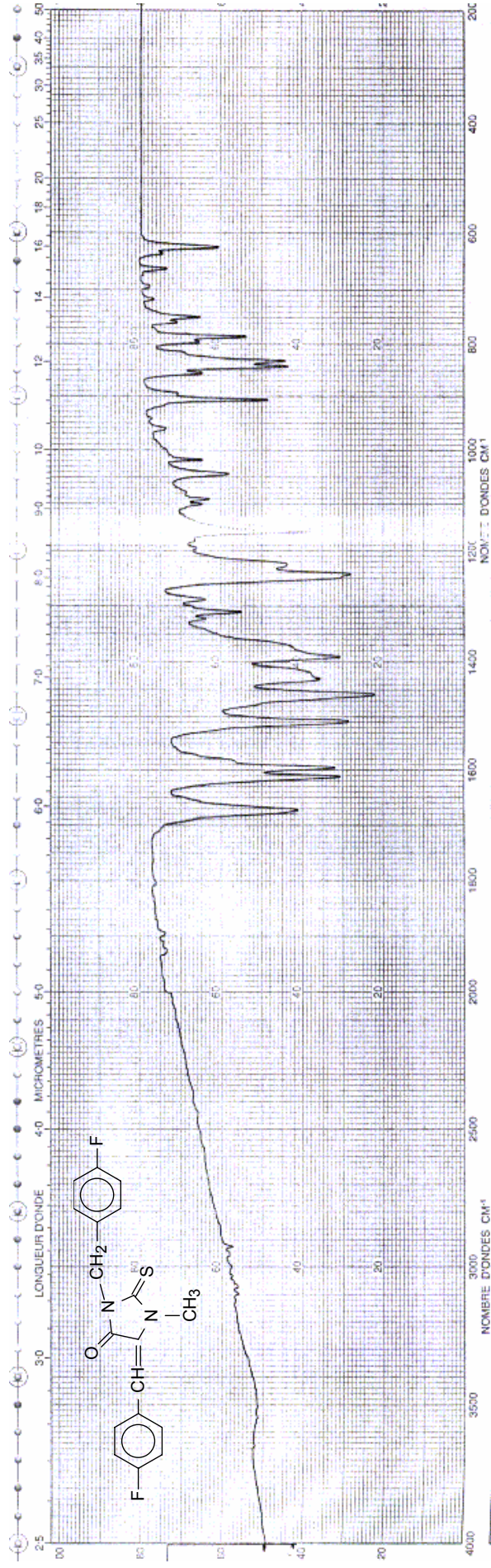


Figura 20: Espectro de infravermelho da 3-(4-fluor-benzil)-5-(4-fluor-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona JT-61

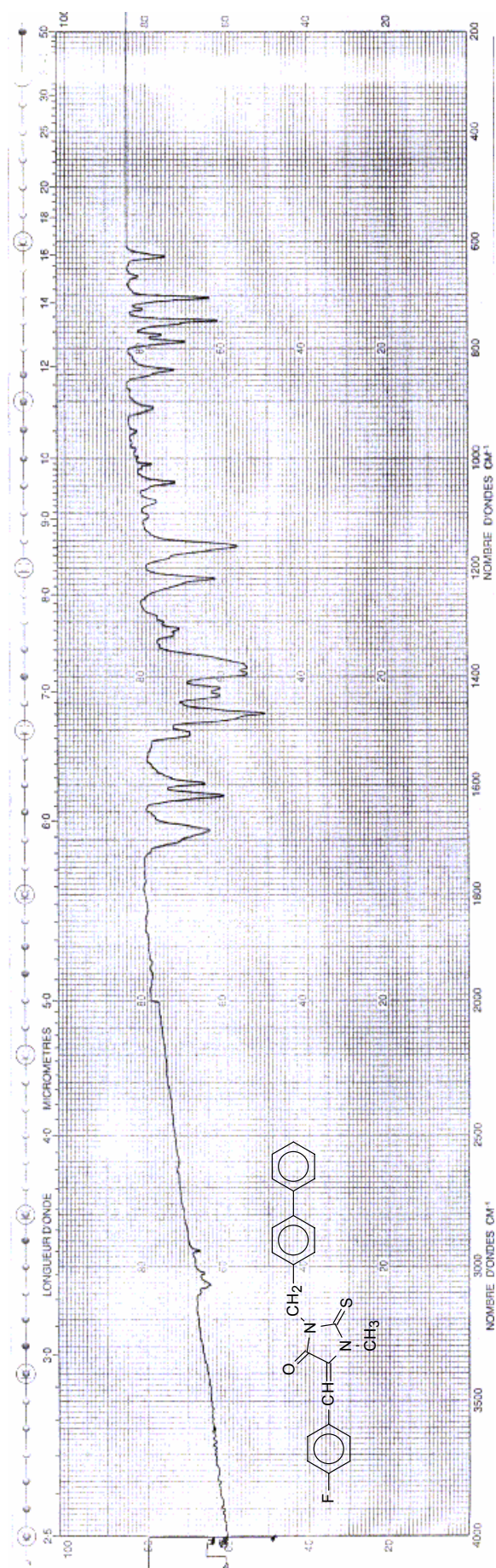


Figura 21: Espectro de infravermelho da 3-(4-fenil-benzil)-5-(4-fluor-benzileno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona JT-62

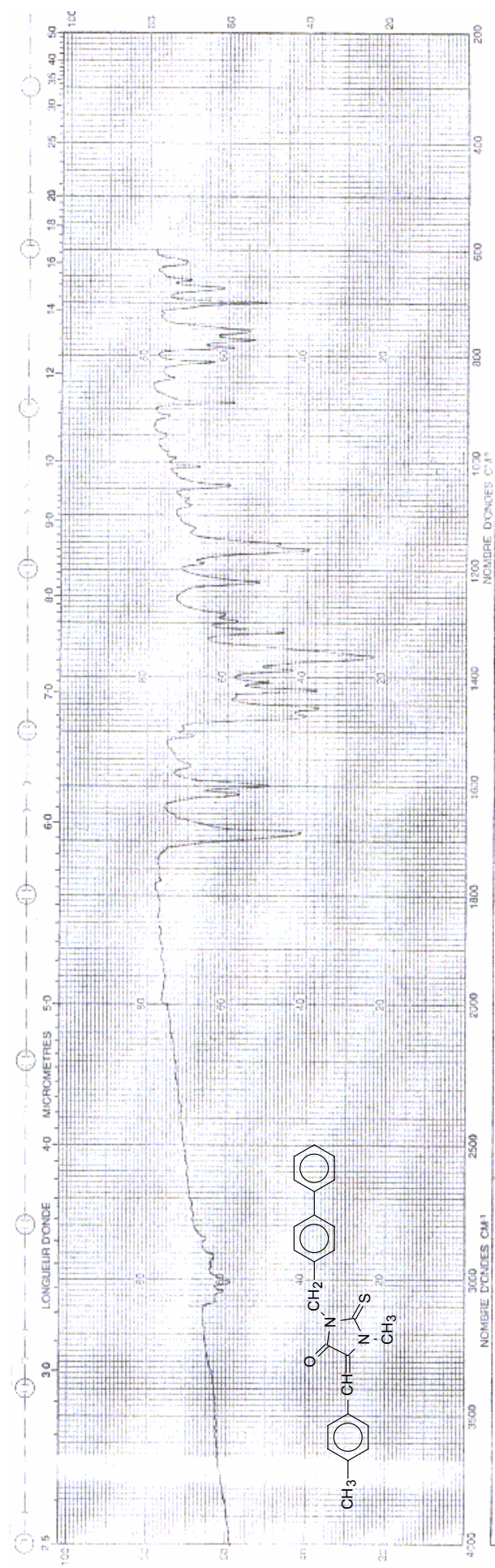


Figura 22: Espectro de infravermelho da 3-(4-fenil-benzil)-5-(4-metil-benzil)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona JT-67



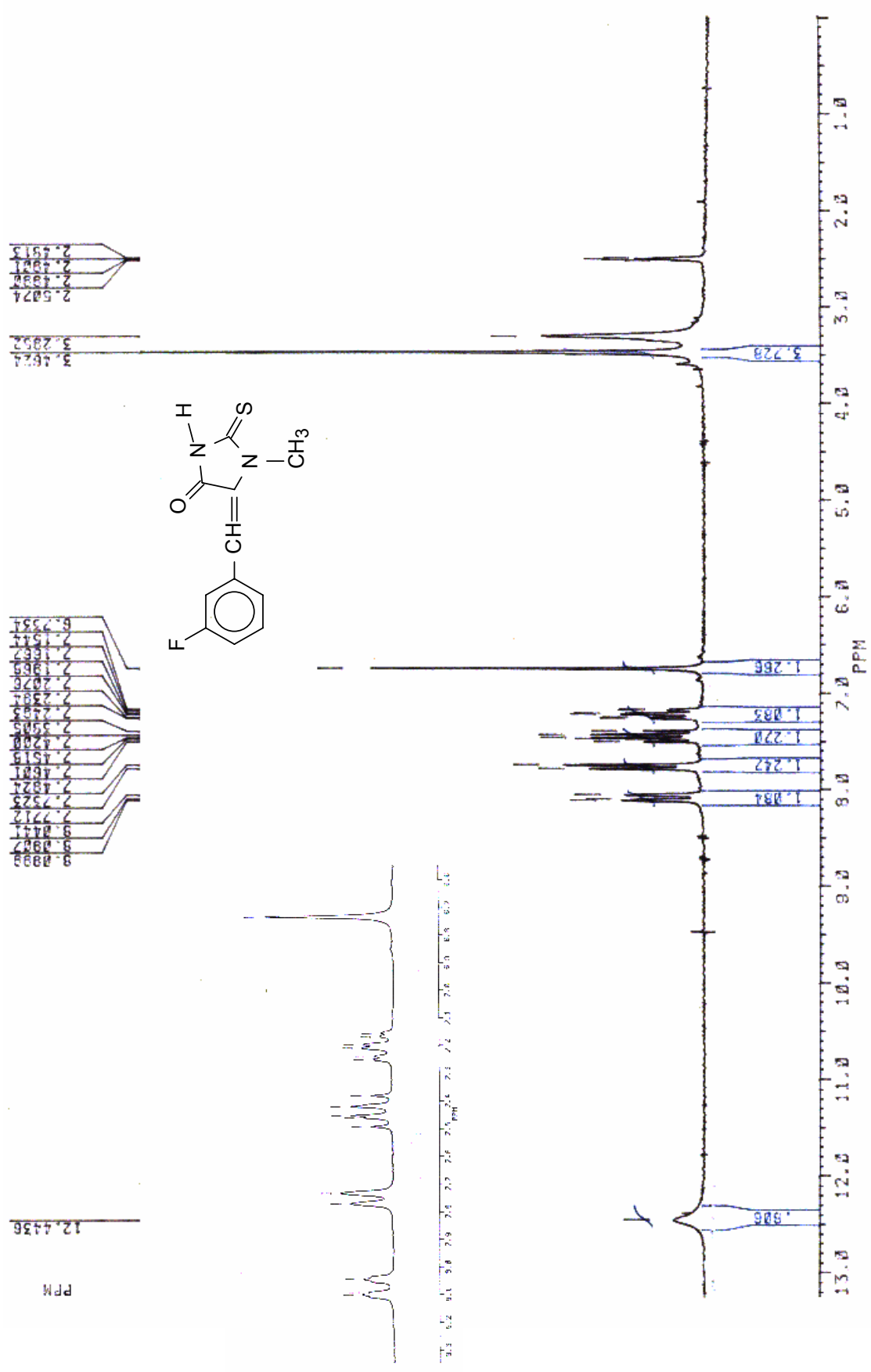


Figura 23: Espectro de ressonância nuclear de hidrogénio da 5-(3-fluor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona HT-12

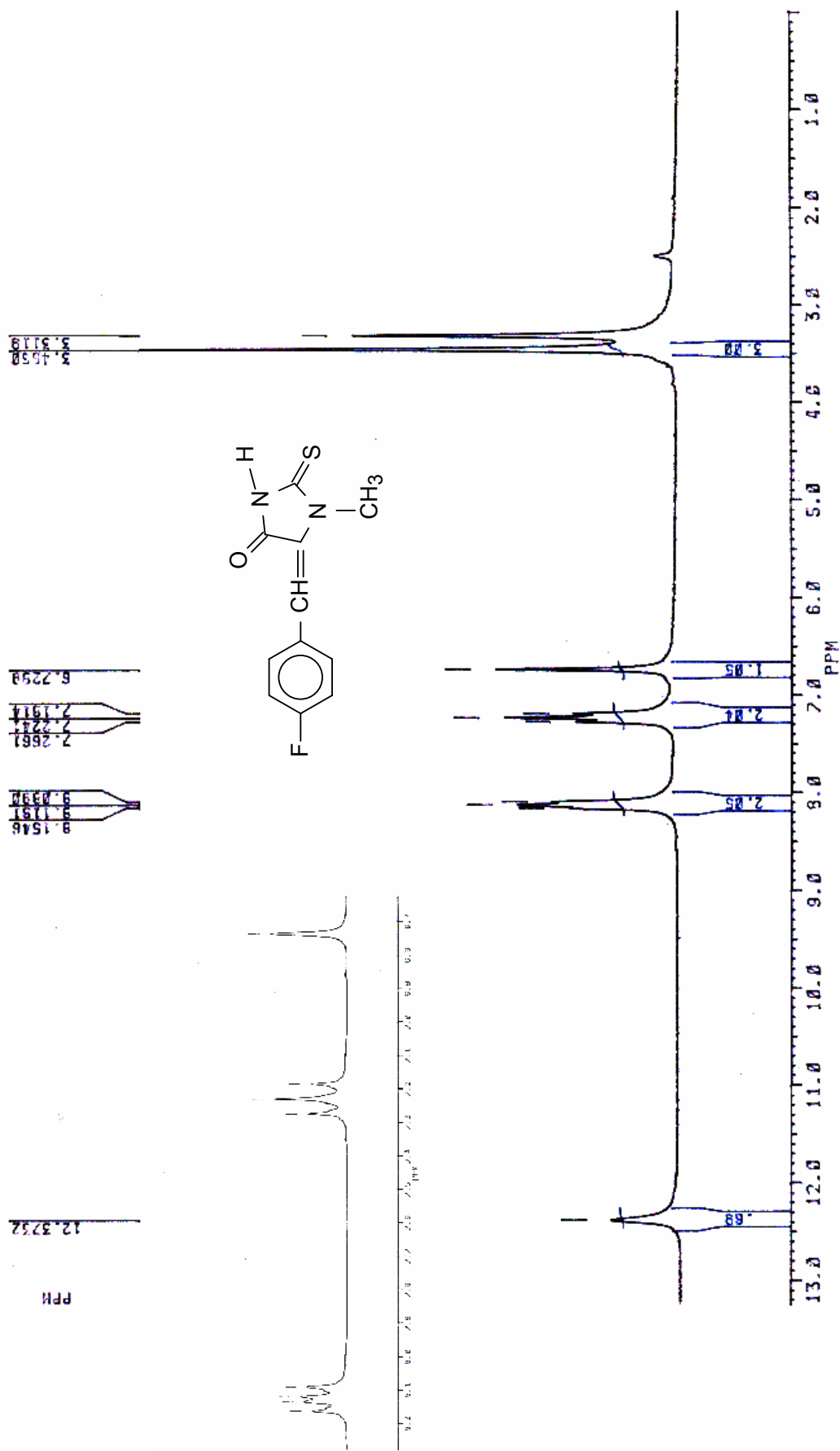


Figura 24: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 5-(4-fluór-benzilideno)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona HT-13

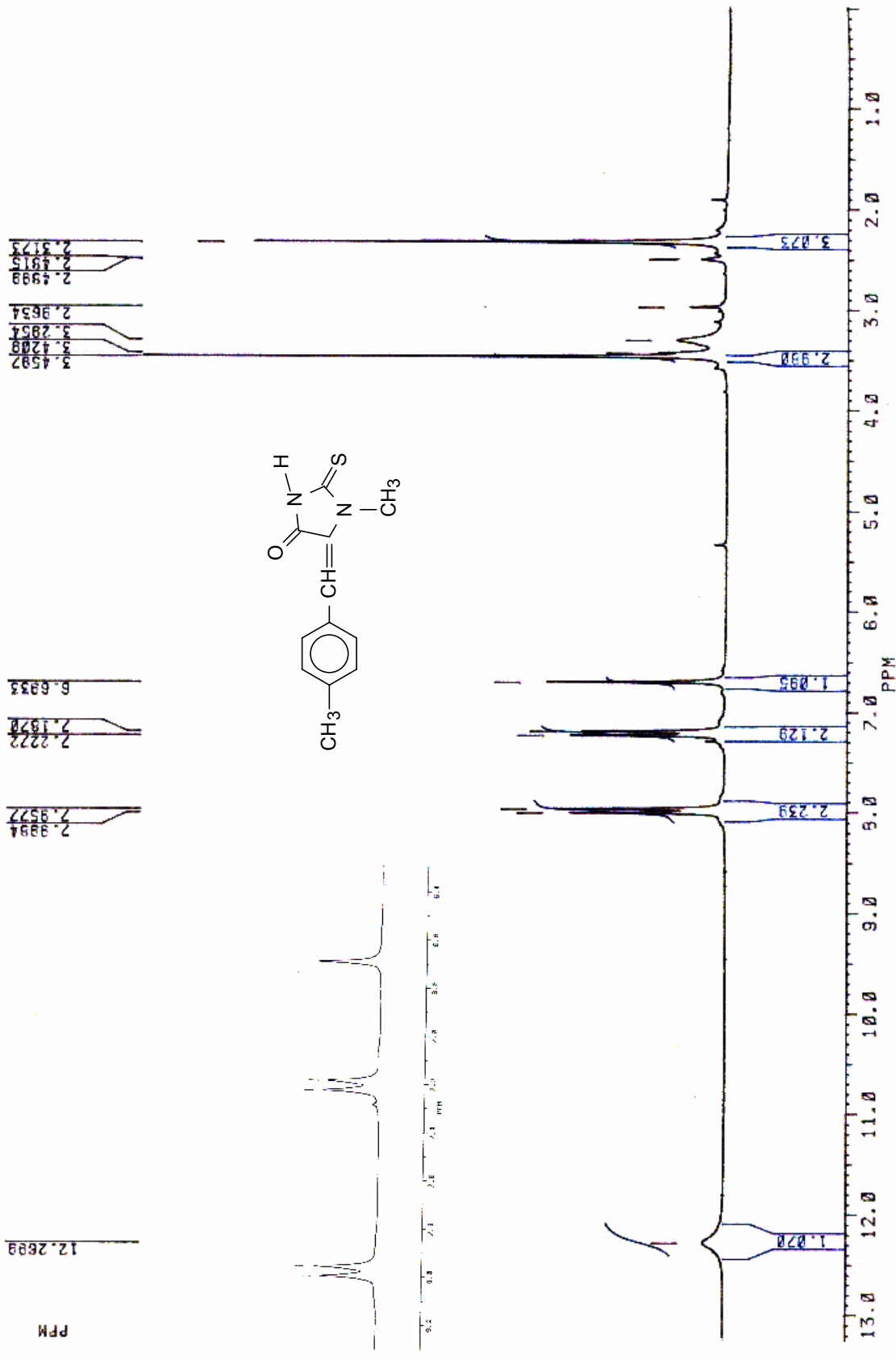


Figura 25: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 5-(4-metil-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona HT-14.

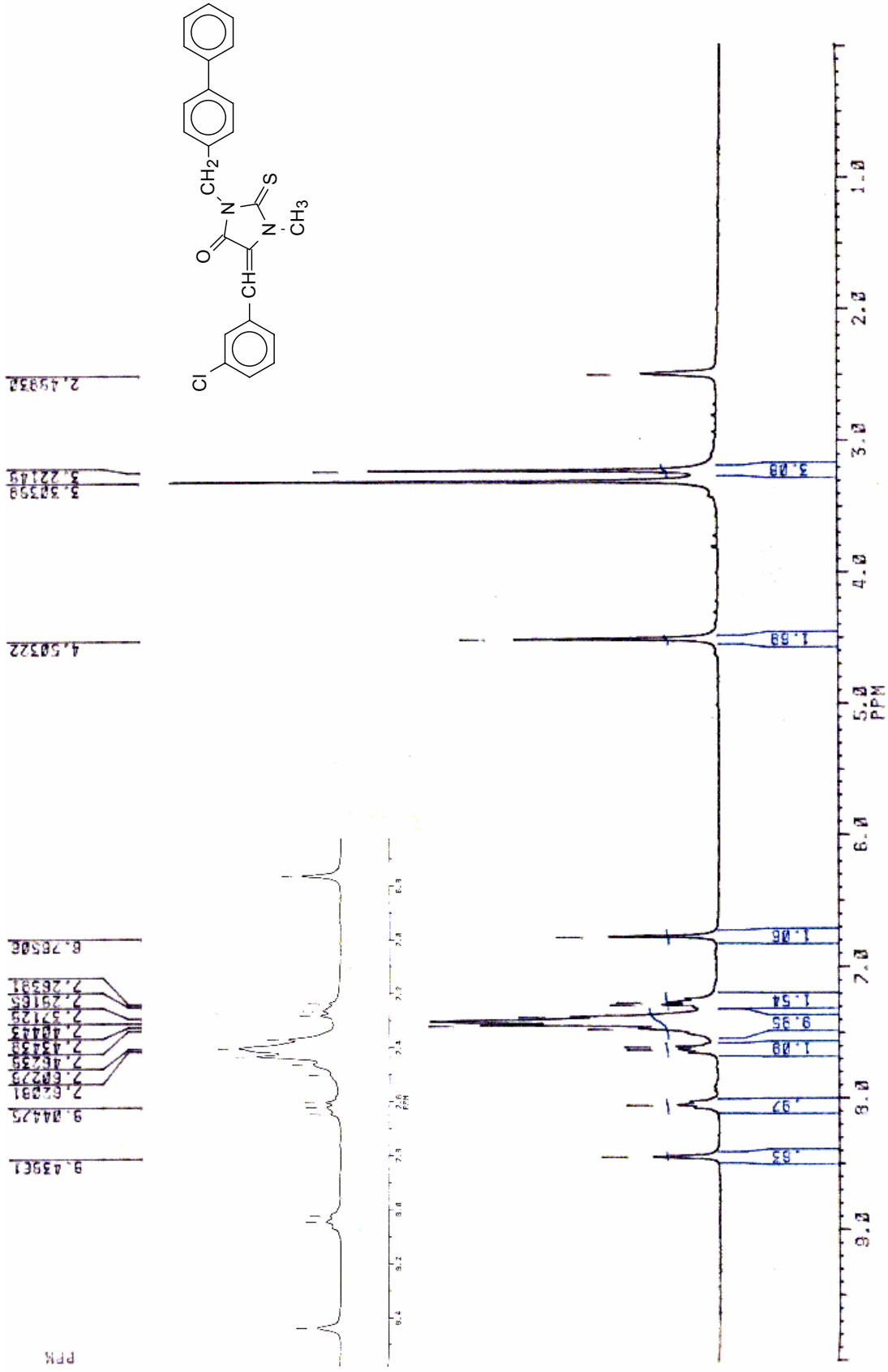


Figura 26: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 5-(3-cloro-benzilideno)-3-(4-fenil-benzil)-1-metil-2-tioxo-imidazolidin-4-ona JT-17.

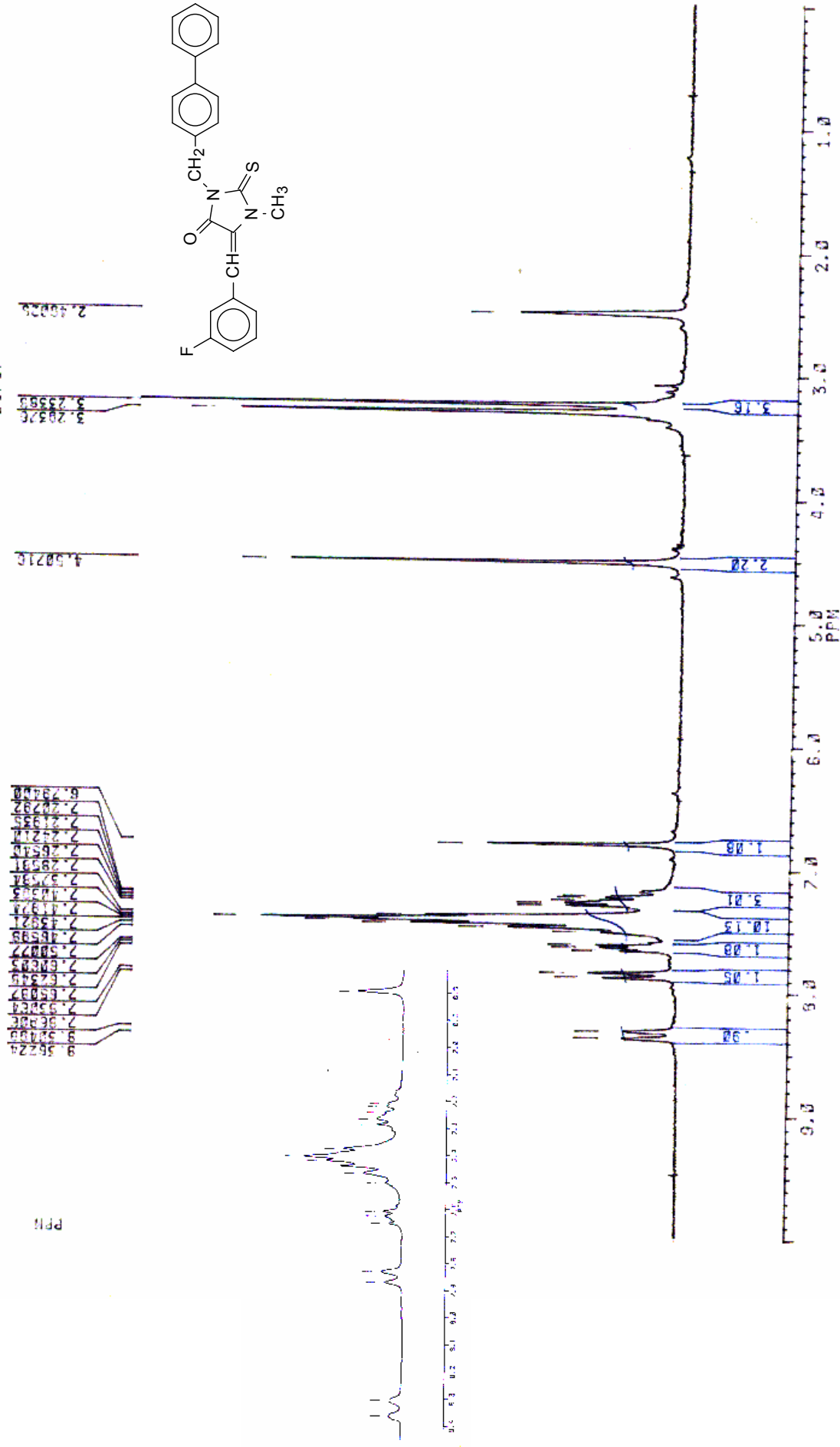


Figura 27: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-(4-fenil-benzil)-5-(3-fluor-benzil)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona JT-57.

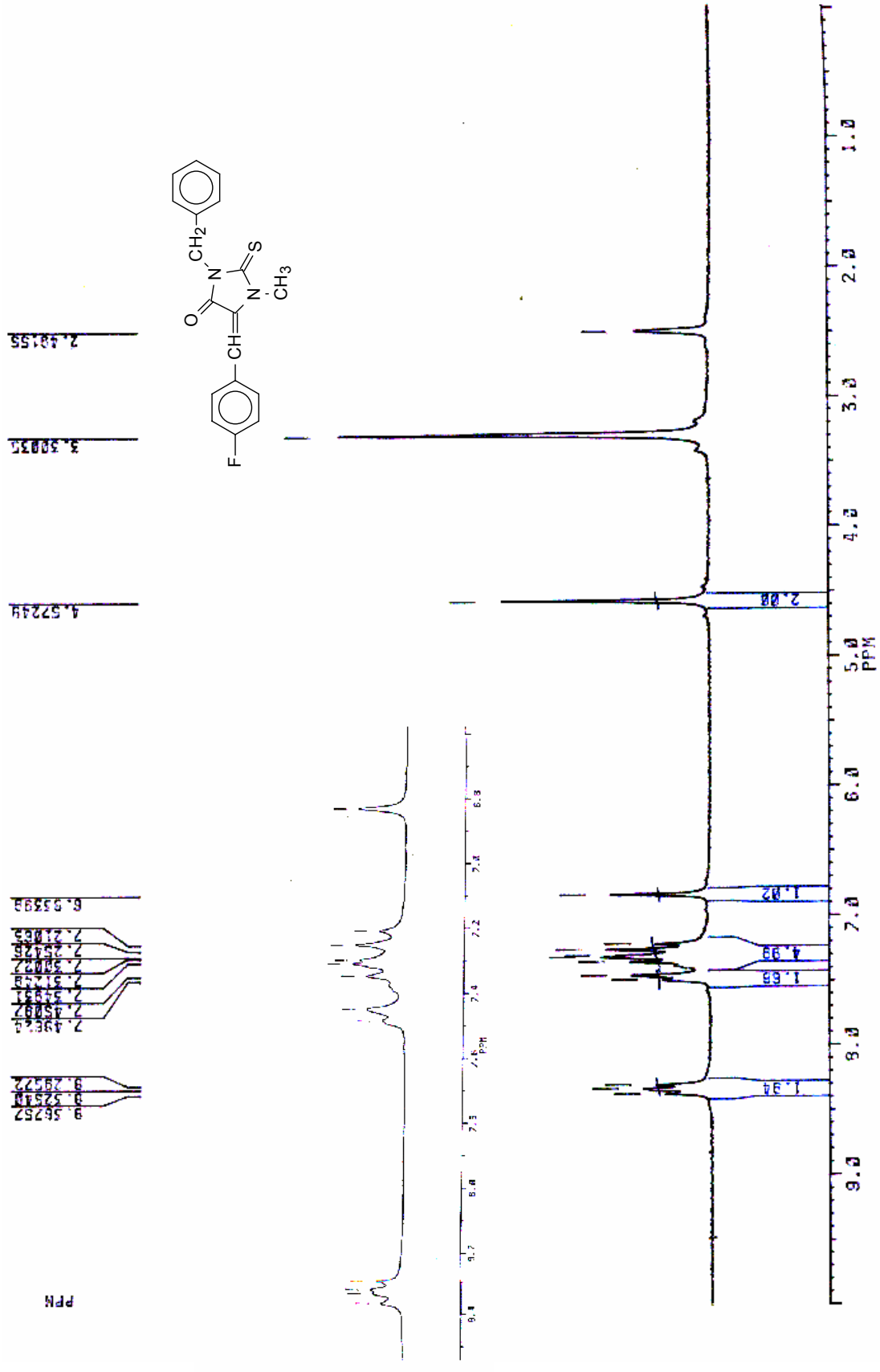


Figura 28: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-benzil-5-(4-fluor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona JT-58

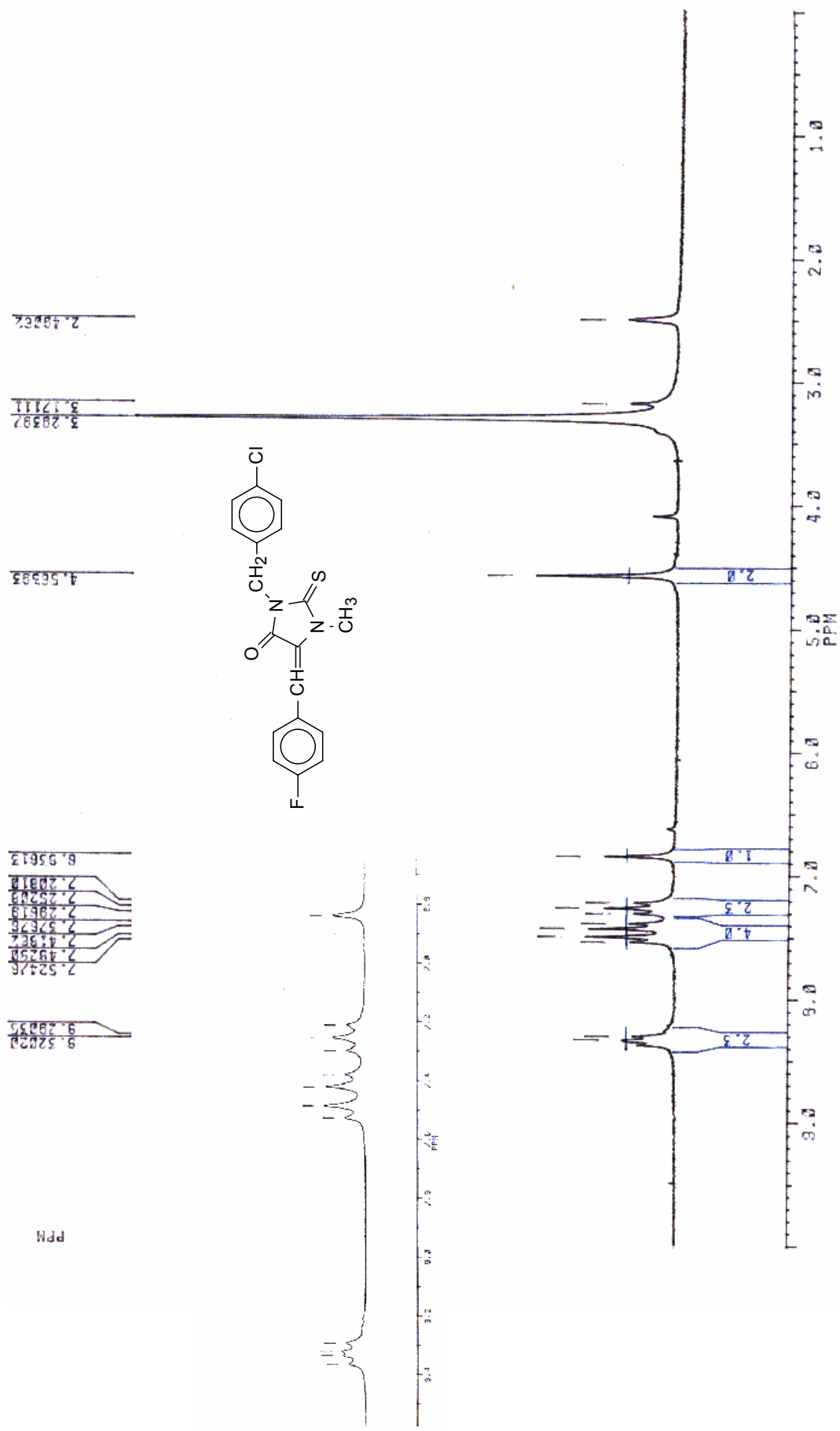


Figura 29: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-(4-cloro-benzil)-5-(4-flúor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona  
JT-59

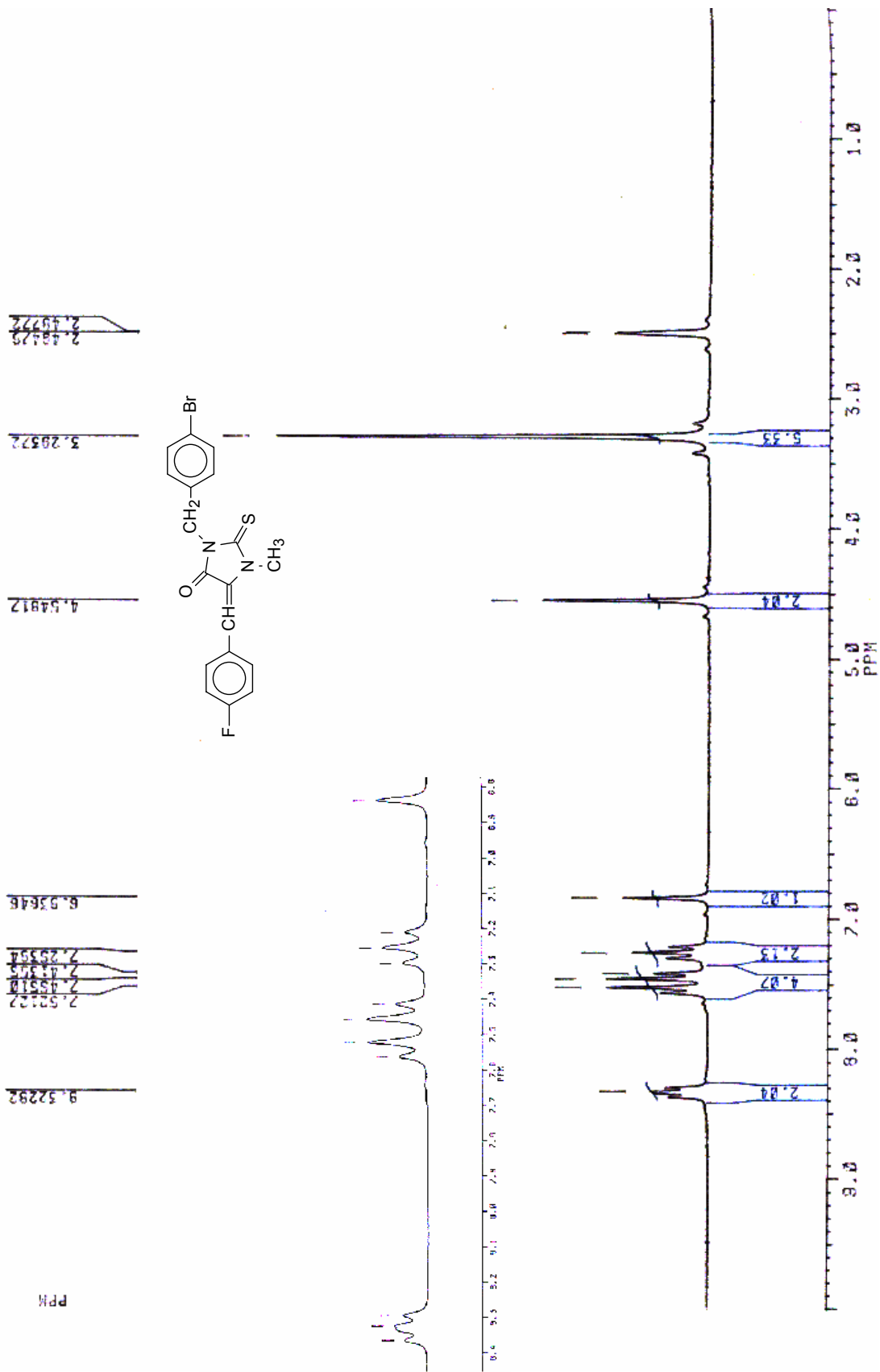


Figura 30: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-(4-bromo-benzil)-5-(4-fluor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona  
JT-60



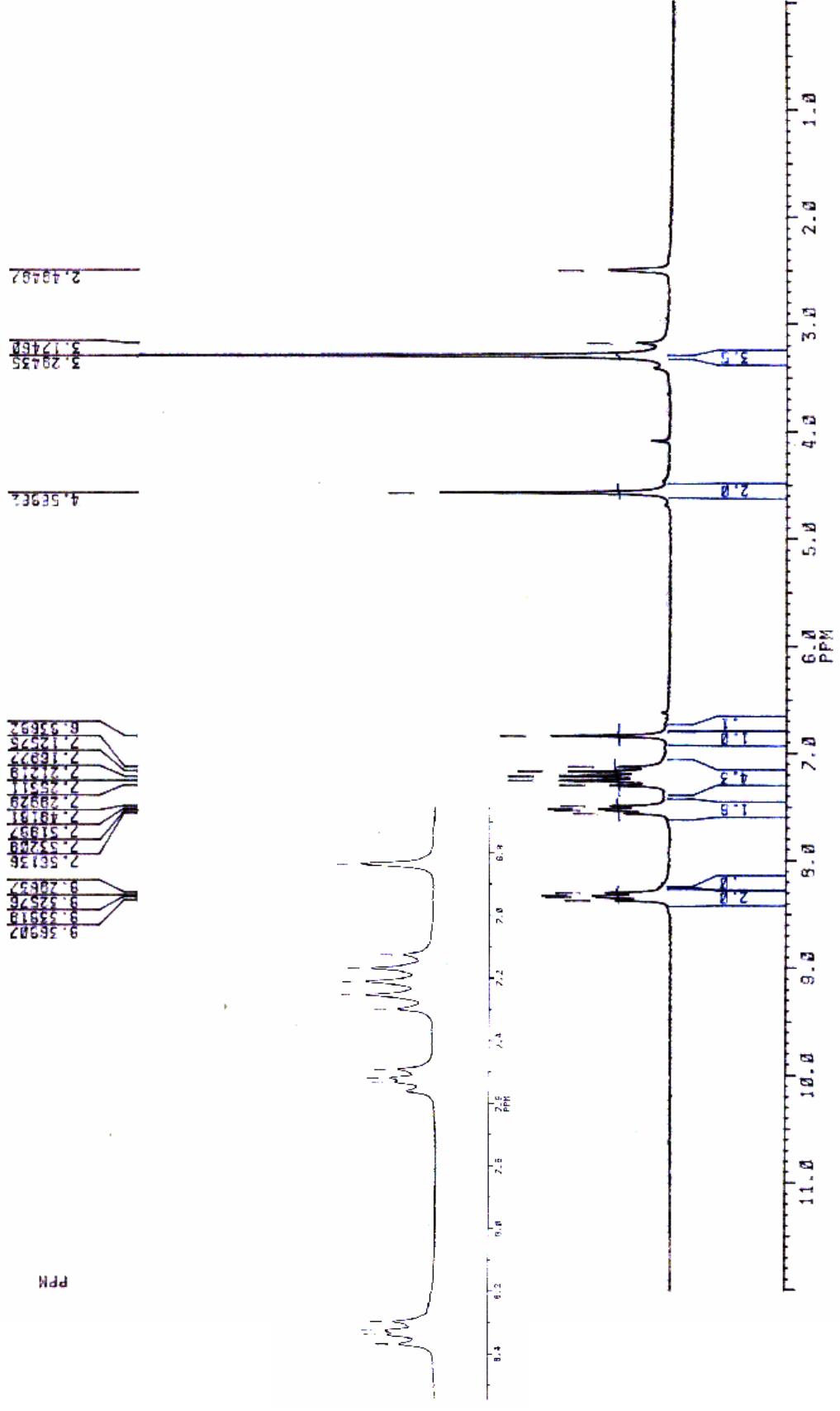


Figura 31: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-(4-fluor-benzil)-5-(4-fluor-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona  
JT-61

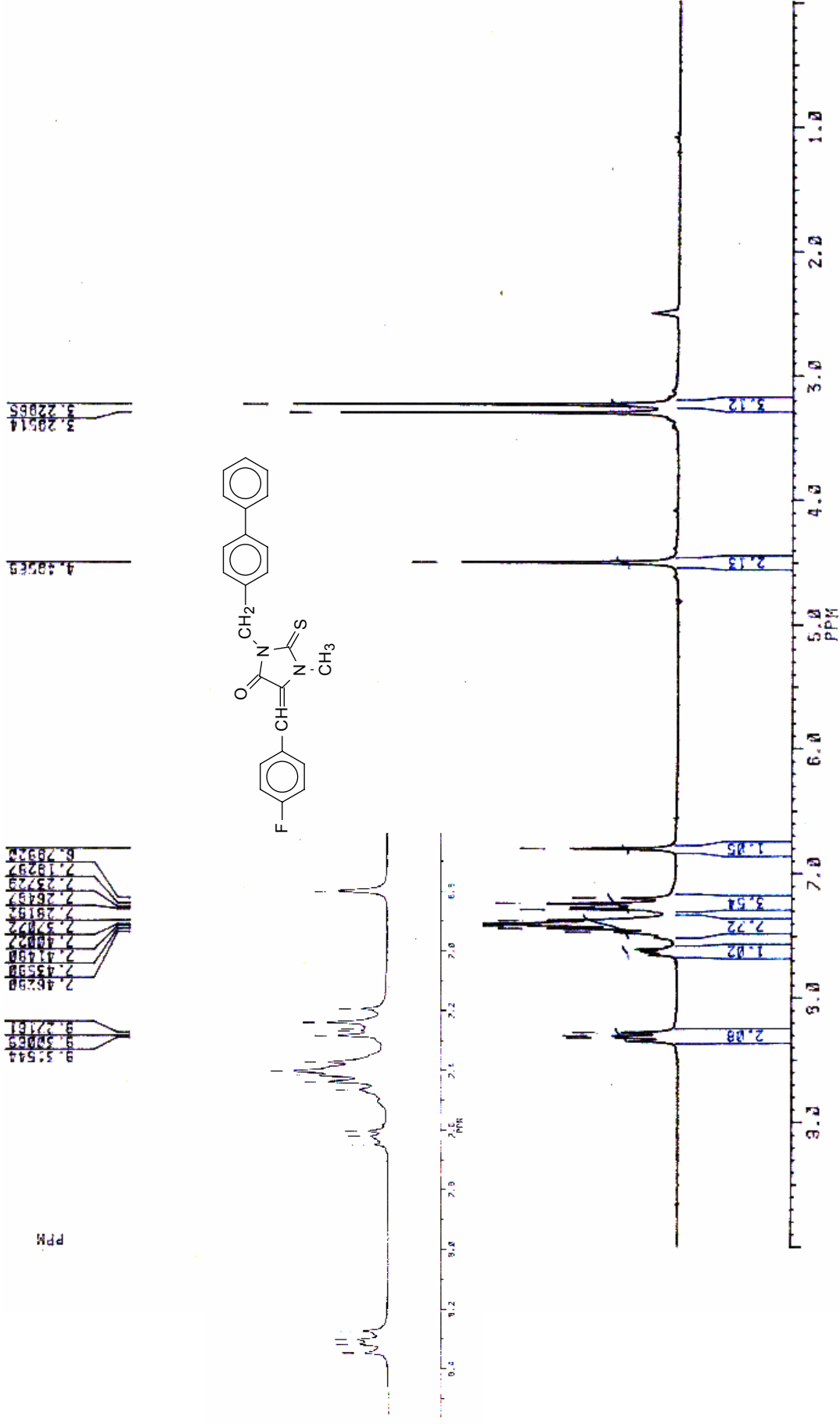


Figura 32: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-(4-fenil-benzil)-5-(4-fluor-benzil)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona  
JT-62

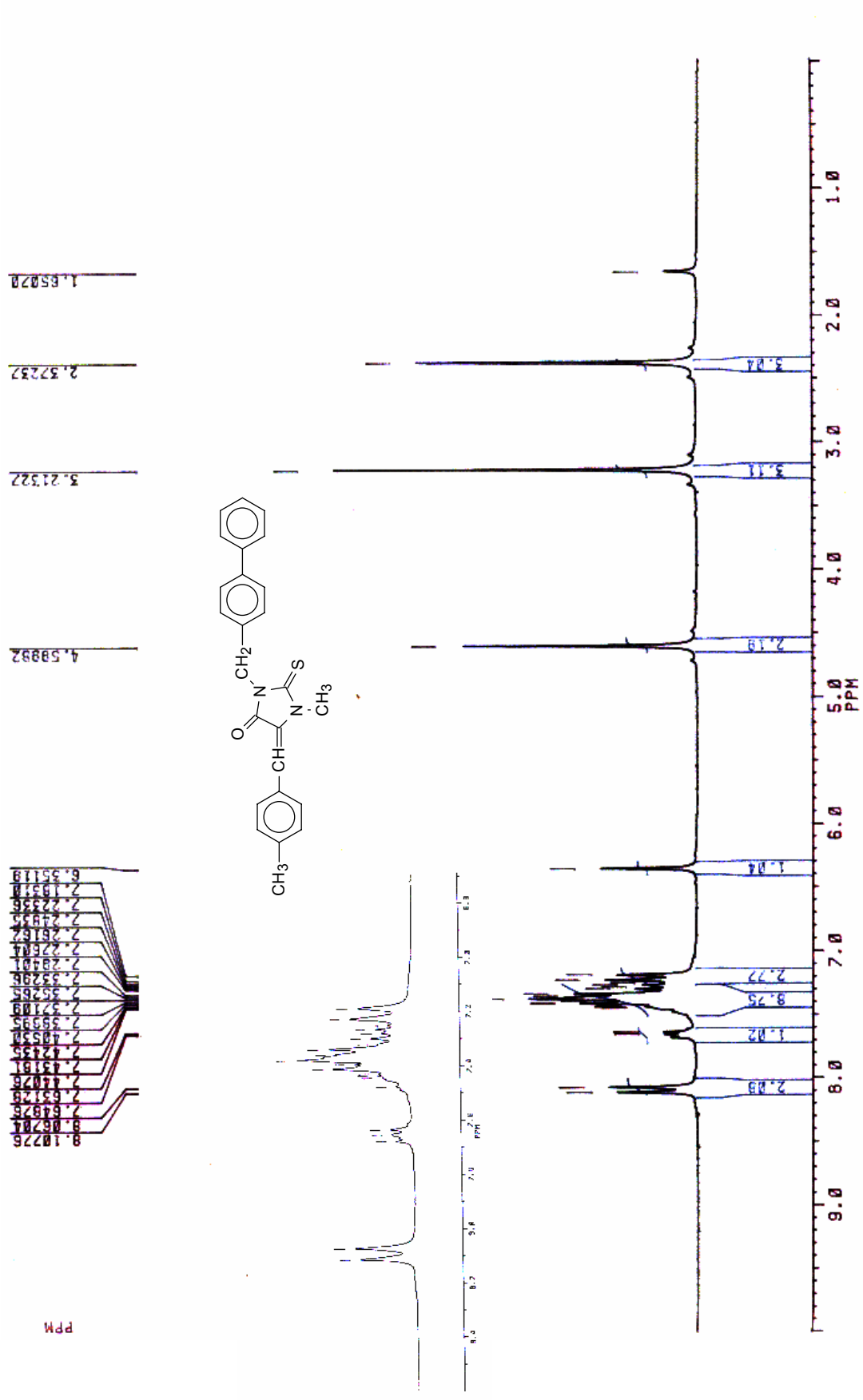


Figura 33: Espectro de ressonância nuclear de hidrogênio da 3-(4-fenil-benzil)-5-(4-metil-benzilideno)-1-metil-2-tioxi-imidazolidin-4-ona J67

### **Anexo 3: Avaliação da suscetibilidade *in vivo* do *Schistosoma mansoni* frente a derivados imidazolidínicos**

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

#### **A- Obtenção de formas evolutivas do parasito**

##### **1- Obtenção de miracídios e infecção de moluscos do gênero *Biomphalaria***

Após obtenção de fezes de camundongos com 50 dias de infecção com *S. mansoni*, o material é homogeneizado em água destilada, filtrado em dupla camada de gaze e deixado sedimentar. Após 3 lavagens do sedimento, este é colocado em placa de Petri sob iluminação artificial, por 30 minutos, a aproximadamente 28°C. Após este período de tempo, a placa é levada à lupa para verificar a presença de miracídios.

Os miracídios eclodidos são contados e capturados utilizando-se lupa e pipeta Pasteur. Grupos de 05 a 10 miracídios são colocados em recipientes de vidro. Moluscos *Biomphalaria*, medindo em torno de 10 milímetros de diâmetro, são expostos individualmente a cada grupo de miracídios durante 2 horas. Decorrido esse tempo, os moluscos são mantidos em aquários. Após 45 dias de infecção, os moluscos são expostos à fonte luminosa para eliminação de cercárias (Standen, 1952).

##### **2- Infecção de camundongos com cercárias de *Schistosoma mansoni*, cepa BH (Belo Horizonte)**

Camundongos Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 20-25 gramas, são expostos às cercárias do parasito utilizando-se a técnica da imersão da cauda. Os camundongos são expostos pela cauda à suspensão cercariana, contendo

aproximadamente 80 cercárias por animal (Olivier e Stirewalt, 1952). Após 2 horas os animais são devolvidos as suas respectivas gaiolas.

#### B- Tratamento dos camundongos infectados

Após 50 dias de infecção, os camundongos são pesados e submetidos a tratamento com o derivado imidazolidínico, por via intra peritoneal e via oral em dose única de 50 mg/mL e em cinco doses consecutivas de 10 mg/mL. Os animais controle recebem o veículo da droga.

#### C- Avaliação da suscetibilidade *in vivo* do *S. mansoni*

A suscetibilidade do *S. mansoni* ao derivado imidazolidínico é avaliada através da alteração do oograma

#### **Anexo 4: Avaliação da suscetibilidade *in vitro* do *Schistosoma mansoni* frente a derivados imidazolidínicos**

O procedimento experimental recomendado para avaliação da suscetibilidade *in vitro* do *S. mansoni* está de acordo com os trabalhos desenvolvidos por Badr *et al.*, 1999 e Barth *et al.*, 1996.

##### **A- Infecção de camundongos com cercárias de *Schistosoma mansoni***

Para infecção de camundongos com cercárias de *Schistosoma mansoni*, cepa BH (Belo Horizonte) utilizamos o mesmo procedimento descrito no anexo 3.

##### **B- Perfusão**

A obtenção de vermes adultos de *S. mansoni* se dá através da perfusão do sistema porta-hepático dos camundongos após 45-50 dias da infecção (Duvall e Dewitt, 1967). Os vermes são expulsos e coletados em placas de Petri contendo meio de cultura RPMI 1640.

##### **C- Preparo do meio e soluções para o cultivo de vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.**

É utilizado o meio RPMI 1640 (SIGMA) suplementado e esterilizado.

Meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute).

A suspensão do meio RPMI em água mili Q obedece as indicações do fabricante.

HEPES - Sal sódico do ácido N-(2-Hidroxietil)-piperazine-N'-(2-etanosulfônico)

Concentração de uso 20mM.

Penicilina 100UI/mL

Concentração de 100UI/mL.

### Estreptomicina

A estreptomicina em pó é pesada de acordo com a quantidade de meio a ser preparado, de forma que a concentração final seja 100µg/mL.

### D- Avaliação da suscetibilidade *in vitro* do *Schistosoma mansoni*

Após remoção dos vermes do hospedeiro definitivo (camundongo), os mesmos são lavados em meio RPMI-1640 acrescido de HEPES 20mM pH = 7,5 e suplementado com penicilina (100UI/ml), estreptomicina (100µg/mL) e soro fetal bovino a 10%. Em seguida, os vermes adultos são transferidos para placas de cultura de tecidos contendo 2mL de meio. cada poço recebe dois vermes, e em seguida são incubados a 37°C, em atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após um período de 2 horas de adaptação ao meio, os derivados imidazolidínicos são adicionados em concentrações que variam de 60 a 120µg/mL. São realizadas duplicatas para cada concentração utilizada. Os parasitos são mantidos durante 15 dias sendo monitorados a cada 24 horas para avaliação do seu estado geral: atividade motora, alterações no tegumento, taxa de mortalidade e pareamento.