

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

**ISABELLA MARIA MONTEIRO DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE  
DERIVADOS EUGENÓLICOS UTILIZANDO FERRAMENTAS BIOQUÍMICAS,  
MOLECULARES E MORFOLÓGICAS**

Alfenas/MG

2020

**ISABELLA MARIA MONTEIRO DE SOUZA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE  
DERIVADOS EUGENÓLICOS UTILIZANDO FERRAMENTAS BIOQUÍMICAS,  
MOLECULARES E MORFOLÓGICAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.  
Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques.  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Aline Pereira Castro.

Alfenas/MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas  
Biblioteca Central – Campus Sede

S729a Souza, Isabella Maria Monteiro de.  
Avaliação *in vitro* e *in silico* da atividade esquistossomicida de derivados eugenólicos utilizando ferramentas bioquímicas, moleculares e morfológicas / Isabella Maria Monteiro de Souza. -- Alfenas/MG, 2020.  
93 f. : il. –

Orientador: Marcos José Marques.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Alfenas, 2020.  
Bibliografia.

1. Schistosoma mansoni. 2. Eugenol. 3. Esquistossomose. 4. Farmacologia. I. Marques, Marcos José. II. Título.

CDD 616.963

## ISABELLA MARIA MONTEIRO DE SOUZA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* E *IN SILICO* DA ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DE DERIVADOS EUGENÓLICOS UTILIZANDO FERRAMENTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Interação Patógeno-Hospedeiro.

Aprovada em: 28 de fevereiro de 2020.

Profa. Dra. Aline Pereira Castro  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Gérsika Bitencourt Santos Barros  
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS

Profa. Dra. Raquel Lopes Martins Souza  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Lopes Martins Sousa, Professor do Magistério Superior**, em 28/02/2020, às 16:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Pereira Castro, Presidente**, em 28/02/2020, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gersika Bitencourt Santos Barros, Usuário Externo**, em 28/02/2020, às 16:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0269667** e o código CRC **AA67F66F**.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

## RESUMO

A esquistossomose é uma doença parasitária crônica causada por parasitos do gênero *Schistosoma*. Atualmente, a quimioterapia é o recurso imediato para minimizar a prevalência e incidência desta doença em todo o mundo, e o único medicamento indicado para o tratamento é o praziquantel (PZQ). No entanto, a dependência de um único fármaco é preocupante, principalmente em áreas endêmicas, onde a quimioterapia repetitiva é constante, podendo favorecer o aparecimento de cepas resistentes ao medicamento. Na literatura já foram relatadas algumas competências do eugenol, tais como atividades antibacterianas e antiparasitárias. Neste sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade *in vitro* de derivados eugenólicos sobre os vermes adultos do *Schistosoma mansoni* utilizando ferramentas bioquímicas e morfológicas; além da análise *in silico*, a fim de elucidar o mecanismo de ação destes compostos sobre o parasito. Desta forma, o uso de diferentes técnicas auxiliou a elucidar o meio pelo qual os derivados eugenólicos agiam sobre o verme. Após realização do *screening* com diversos derivados eugenólicos em diferentes doses, selecionou-se três compostos e determinou-se assim seu ED<sub>50</sub>, sendo, portanto, FB1 (62,19µg/ml), FB4 (41,04µg/ml) e FB9 (100,67 µg/ml). Assim, foi feita uma análise biomolecular sobre o sistema excretor e lesão de tegumento do parasito utilizando microscopia de fluorescência e eletrônica de varredura. Além disso, foram realizados ensaios bioquímicos com o verapamil e a ouabaína, antagonistas dos canais de cálcio e da bomba Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase, respectivamente. Complementarmente, foram realizadas análises *in silico* para avaliar a interação dos derivados em questão e estes canais. Os derivados eugenólicos provocaram lesão no tegumento e no sistema excretor dos vermes adultos de *S. mansoni*, fato comprovado através das sondas fluorescentes de marcação e microscopia eletrônica de varredura, principalmente o derivado FB4 na concentração 80 µg / mL. Além disso, pôde-se observar o retardamento da morte dos vermes adultos comparando presença/ausência de ouabaína, 192/72h; 192/168h associado ao FB1 e FB9, respectivamente. Por outro lado, não se viu alterações quando em contato com o antagonista do canal de cálcio, que somente inibiu a ação do PZQ. Sendo assim, um dos prováveis mecanismos de ação dos derivados eugenólicos está relacionado com a inibição do canal de sódio, o que pode estar relacionado com o que já foi descrito para os compostos eugenólicos. Foi observado que o composto que melhor interagiu com estes canais foram o FB1 e FB9, mas foram os que apresentaram maior ED<sub>50</sub> e os de menor efeito no tegumento dos vermes adultos. De modo oposto o derivado FB4 foi o que menos interagiu no contexto *in silico* e o de menor ED<sub>50</sub> e maior efeito no tegumento. Desta forma pode-se concluir que os derivados eugenólicos atuam sobre o parasito de forma mais ativa quando atuam no tegumento dos vermes adultos do *S. mansoni*.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Eugenol. Esquistossomose. Mecanismo de ação.

## ABSTRACT

Schistosomiasis is a chronic parasitic disease caused by parasites of the genus *Schistosoma*. Currently, chemotherapy is the immediate resource to minimize the prevalence and incidence of this disease worldwide, and the only medication indicated for treatment is praziquantel (PZQ). However, the dependence on a single drug is worrying, especially in endemic areas, where repetitive chemotherapy is constant, which may favor the appearance of strains resistant to the drug. Some competences of eugenol have been reported in the literature, such as antibacterial and antiparasitic activities. In this sense, this work aimed to evaluate the *in vitro* activity of eugenolic derivatives on adult worms from *Schistosoma mansoni* using biochemical and morphological tools; in addition to *in silico* analysis, in order to elucidate the mechanism of action of these compounds on the parasite. In this way, the use of different techniques helped to elucidate the means by which the eugenolic derivatives acted on the worm. After performing screening with different eugenolic derivatives at different doses, three compounds were selected and their ED<sub>50</sub> was thus determined, thus being FB1 (62.19µg / ml), FB4 (41.04 µg / ml) and FB9 (100, 67 µg / ml). Thus, a biomolecular analysis was performed on the excretory system and skin damage of the parasite using fluorescence microscopy and scanning electron. In addition, biochemical tests were performed with verapamil and ouabain, antagonists of the calcium channels and the Na + K + ATPase pump, respectively. In addition, *in silico* analyzes were carried out to evaluate the interaction of the derivatives in question and these channels. The eugenolic derivatives caused damage to the tegument and the excretory system of the adult worms of *S. mansoni*, a fact confirmed by the fluorescent marking probes and scanning electron microscopy, mainly the FB4 derivative at 80 µg / mL concentration. In addition, it was possible to observe the delay in the death of adult worms by comparing the presence / absence of ouabain, 192 / 72h; 192 / 168h associated with FB1 and FB9, respectively. On the other hand, no changes were seen when in contact with the calcium channel antagonist, which only inhibited the action of PZQ. Thus, one of the likely mechanisms of action of eugenolic derivatives is related to sodium channel inhibition, which may be related to what has already been described for eugenolic compounds. It was observed that the compound that best interacted with these channels were FB1 and FB9, but they were the ones that had the highest ED<sub>50</sub> and those with the least effect on the coat of adult worms. Conversely, the FB4 derivative was the one that least interacted in the *in silico* context and the one with the lowest ED<sub>50</sub> and the greatest effect on the integument. In this way, it can be concluded that the eugenolic derivatives act on the parasite more actively when they act on the integument of the adult worms of *S. mansoni*.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. Eugenol. Schistosomiasis. Mechanism of action.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Ciclo de vida do <i>Schistosoma</i> .....	17
Figura 2 -	Esquema proposto para a síntese do eugenol.....	34
Figura 3 -	Esquema da recuperação dos vermes adultos e dos ensaios <i>in vitro</i> . ....	37
Figura 4 -	Esquema da avaliação de alvos característicos para novos medicamentos - tegumento e sistema excretor - do <i>Schistosoma mansoni</i> .....	39
Figura 5 -	Cultura <i>in vitro</i> de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> expostos ao PZQ e RPMI-1640.....	53
Figura 6 -	Cultura <i>in vitro</i> de vermes adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> expostos aos derivados eugenólicos.....	55
Figura 7 -	Sítios conservados na estrutura modelada da subunidade alfa de SNaK1: sítio catalítico de fosforilação (em laranja), domínio de ligação de ATP (em azul) e domínio de ligação para vanadato (em rosa) .....	65
Figura 8 -	Interação dos derivados de eugenol com a subunidade alfa da Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase de <i>S. mansoni</i> (modelo 1). A) Representação em superfície da enzima e destaque (tracejado vermelho) da região de interação dos ligantes estudados. B) Representação em fita da enzima e destaque (tracejado vermelho) da região de interação dos ligantes estudados. C) Destaque para região de interação dos derivados eugenólicos (carbonos em branco) e posição relativa à posição de interação do ADP (carbonos em verde) encontrada para a estrutura PDB 3WGU. ....	68
Figura 9 -	Interação dos derivados de eugenol FB1 (A), FB4 (B) E FB9 (C) (carbonos em branco) com o sítio catalítico da Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase de <i>S. mansoni</i> (modelo 1 – carbonos em verde). Interações do tipo cátion-pi são mostradas como linha tracejada de cor amarela e ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas verdes.....	69
Figura 10 -	Interação dos derivados de eugenol FB1, FB4 e FB9 (carbonos em branco) com o sítio catalítico da Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase de <i>S. mansoni</i> (modelo 1 – carbonos em verde) destacando os aminoácidos envolvidos em interações de Van der Waals com os ligantes. ....	69
Figura 11 -	Interação dos derivados de eugenol com a subunidade alfa da Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase de <i>S. mansoni</i> (modelo 2). A) Representação em superfície da enzima e destaque (tracejado vermelho) da região de interação dos ligantes estudados. B) Representação em fita da enzima e destaque (tracejado vermelho) da região de interação dos ligantes estudados. C) Destaque para região de interação dos derivados eugenólicos (carbonos em branco) e posição relativa à posição de interação da ouabaína (carbonos em verde) encontrada para a estrutura PDB 3A3Y. ....	71
Figura 12 -	Interação dos derivados de eugenol FB1 (A), FB4 (B) E FB9 (C) (carbonos em branco) com o sítio da ouabaína na Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase de <i>S. mansoni</i> (modelo 2 – carbonos em verde). Interação do tipo cátion-pi é mostrada como linha tracejada de cor amarela, ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas verdes e empilhamento pi em T é mostrada como linha tracejada rosa. ....	71
Figura 13 -	Marcação de danos no sistema excretor de vermes adultos pela sonda Resorufina .....	73
Figura 14 -	Marcação de lesões de tegumento pela sonda Hoechst 33258 .....	75
Figura 15 -	Fotomicrografias eletrônicas de varredura de vermes adultos de <i>Shistosoma mansoni</i> tratados com diferentes doses de derivados eugenólicos. Imagens representativas do final das 192h (período de observação) após o contato dos parasitos com diferentes doses de FB1, FB4 e FB9.....	78



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Espécies de parasitos e distribuição geográfica da esquistossomose .....	18
Tabela 2 -	Doses utilizadas para Avaliação do dano tegumentar por MEV induzido por derivados eugenólicos .....	41
Tabela 3 -	Dose efetiva da resposta relativa à eficácia das substâncias testadas (ED <sub>50</sub> , ED <sub>90</sub> e ED <sub>100</sub> ) em µg/ml .....	47
Tabela 4 -	Motilidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> após exposição à diferentes concentrações do derivado eugenólicos FB1, até 192 horas de incubação.....	49
Tabela 5 -	Motilidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> após exposição à diferentes concentrações do derivado eugenólicos FB4, até 192 horas de incubação.....	50
Tabela 6 -	Motilidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> após exposição à diferentes concentrações do derivado eugenólicos FB9, até 192 horas de incubação.....	51
Tabela 7 -	Efeito dos tratamentos sobre a separação de casais de <i>S. mansoni</i> e eliminação de ovos até 192 horas de incubação .....	52
Tabela 8 -	Resultados obtidos a partir dos estudos de docking entre os derivados de eugenol e os modelos 1 e 2 obtidos para a enzima Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -ATPase de <i>S. mansoni</i> .....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
DTNs	Doenças Tropicais Negligenciadas
HVA	<i>High Voltage Activated</i>
LVA	<i>Low Voltage Activated</i>
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
OMS	Organização Mundial de Saúde
Pgp	Glicoproteína P
PZQ	Praziquantel
UNIFAL-MG	Universidade Federal de Alfenas
VOCC	Voltage Operated Calcium Channels

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	<b>15</b>
2.1	DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS.....	15
2.2	PARASITO – CICLO E TRANSMISSÃO .....	15
2.3	EPIDEMIOLOGIA .....	17
2.4	CONTROLE E TRATAMENTO.....	19
2.5	DIFICULDADES NO TRATAMENTO ATUAL.....	21
2.6	ALVOS CARACTERÍSTICOS PARA NOVOS MEDICAMENTOS.....	22
2.6.1	Tegumento .....	22
2.6.2	Sistema excretor.....	23
2.7	FERRAMENTAS QUE AUXILIAM O ENTENDIMENTO DO MECANISMO DE AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E O <i>Schistosoma mansoni</i> .....	24
2.8	CONTROLE DA MOTILIDADE NO VERME ADULTO .....	25
2.8.1	Canais de cálcio .....	26
2.8.2	Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> - ATPase .....	28
2.9	EUGENOL E SEU POTENCIAL NO TRATAMENTO DE PARASIToses	29
2.9.1	Compostos eugenólicos e helmintos .....	30
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>34</b>
4.1	OBTENÇÃO DOS DERIVADOS.....	34
4.2	ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	34
4.2.1	Parasitas .....	34
4.2.2	Manutenção dos animais.....	35
4.2.3	Infecção dos animais.....	35
4.2.4	Recuperação dos vermes adultos .....	35
4.2.5	Avaliação dos derivados eugenólicos <i>in vitro</i> .....	36
4.2.6	Determinação da dose efetiva (ED <sub>50</sub> ).....	37
4.2.7	Avaliação <i>in vitro</i> da atividade excretora e lesão de tegumento dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> expostos aos derivados eugenólicos por meio de sondas fluorescentes .....	38

4.2.8	Avaliação da atividade do sistema excretor do verme adulto de <i>S. mansoni</i> exposto aos derivados eugenólicos após marcação com a sonda Resorufina.....	39
4.2.9	Avaliação do dano causado ao tegumento do verme adulto de <i>S. mansoni</i> exposto aos derivados eugenólicos após marcação com a sonda Hoechst 33258 .....	40
4.2.10	Microscopia de fluorescência (preparo das lâminas para leitura).....	40
4.2.11	Avaliação do dano tegumentar por Microscopia Eletrônica de Varredura induzido por derivados eugenólicos .....	41
4.2.12	Avaliação <i>in vitro</i> do efeito do eugenol na atividade esquistossomicida em contato com o verapamil, um antagonista do canal de cálcio, em vermes adultos do <i>S. mansoni</i> .....	42
4.2.13	Avaliação <i>in vitro</i> do efeito do eugenol na atividade esquistossomicida em contato com a ouabaína, um antagonista da Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> ATPase, em vermes adultos do <i>S. mansoni</i> .....	43
4.3	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> .....	44
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>46</b>
5.1	ANÁLISE <i>IN VITRO</i> .....	46
5.1.1	<i>Screening</i> .....	46
5.1.2	Determinação do ED <sub>50</sub> dos derivados eugenólicos e praziquantel .....	46
5.1.3	Efeito dos derivados eugenólicos sobre a atividade motora dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	47
5.1.4	Efeito dos derivados eugenólicos sobre o acasalamento e eliminação de ovos dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	52
5.1.5	Efeito dos derivados eugenólicos sobre a mortalidade dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> .....	55
5.1.6	Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> do verapamil, um antagonista do canal de cálcio em vermes adultos do <i>S. mansoni</i> .....	59
5.1.7	Avaliação da atividade esquistossomicida <i>in vitro</i> da ouabaína, um antagonista da Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> - ATPASE em vermes adultos do <i>S. mansoni</i> .....	61
5.2	ANÁLISE <i>IN SILICO</i> .....	64
5.3	ANÁLISE BIOMOLECULAR.....	72
5.3.1	Avaliação da atividade do sistema excretor dos vermes adultos de <i>S. mansoni</i> exposto aos derivados eugenólicos após marcação com a sonda Resorufina.....	72
5.3.2	Avaliação de danos no tegumento de vermes adultos expostos aos derivados eugenólicos <i>in vitro</i> usando a sonda Hoechst 33258.....	74
5.4	ANÁLISE DO DANO TEGUMENTAR INDUZIDO POR DERIVADOS EUGENÓLICOS .....	76
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>79</b>

<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFAL .....</b>	<b>92</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As doenças tropicais negligenciadas (DTNs) são um grupo de doenças parasitárias e bacterianas que acometem mais de um bilhão de pessoas no mundo todo. Estas doenças afetam majoritariamente pessoas mais pobres e prejudicam seu desenvolvimento físico e cognitivo, dificultam a agricultura ou a subsistência familiar e limitam a produtividade no local de trabalho. Como resultado, as DTNs prendem os pobres em um ciclo de pobreza e doença. Entre as doenças tropicais negligenciadas mais proeminentes está a esquistossomose, uma doença helmíntica causada pelo *Schistosoma* spp (CDC, 2018; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018).

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada que está diretamente associada à pobreza e ao subdesenvolvimento. Ela tem como fator principal a falta de saneamento básico e coabitação às coleções de água contaminada. Aproximadamente 207 milhões de pessoas estão infectadas em 76 países, sendo que destas, 120 milhões apresentam sintomas e 20 milhões manifestam a doença na forma grave. Além disso, cerca de 779 milhões de pessoas estão sob o risco de infecção no mundo (CHITSULO et al., 2004; STEINMANN et al., 2006).

Apesar de atingir milhares de pessoas no mundo todo, ainda não existe uma vacina para a esquistossomose e o tratamento depende inteiramente de um fármaco, o praziquantel (PZQ) (DOENHOFF et al., 2009). No entanto, a ineficácia deste medicamento contra as formas jovens da esquistossomose em desenvolvimento no hospedeiro e o surgimento de cepas resistentes ao PZQ, tem motivado a busca de novos compostos ativos contra este helminto (MAGALHÃES et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2010).

O uso de plantas para tratar doenças e distúrbios da saúde é feito desde os primórdios pelos seres humanos. É sabido também que muitas destas plantas possuem atividades biológicas, incluindo atividades antiparasitárias. Além disso, muitas infecções causadas por parasitos são tratadas por produtos vegetais ou metabólitos secundários isolados a partir deles (WINK, 2012).

O eugenol (4 alil 2 metoxifenol) é um componente monoterpeneo natural obtido do óleo de cravo, que possui várias propriedades biológicas, incluindo atividades

antioxidante, antiinflamatória, analgésica, antipirética, antibacteriana, antifúngica e antitumoral (FOUND, 2011). Além disso, é usado na medicina como um antisséptico local e anestésico e já foi relatado pela *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos) como um composto antioxidante de ocorrência natural e segura (DUTTA, 2015). Além das atividades biológicas citadas acima, os derivados eugenólicos também possuem atividades antiparasitárias, como antitripanossomais (SANTORO et al., 2007), antimalárica (BAGAVAN et al., 2011), anti-*Leishmania* (ISLAMUDDIN et al., 2016; MORAIS et al., 2014), potencial terapêutico contra *T. cruzi* (GRECCO et al., 2017) e efeito moluscicida contra os vetores da esquistossomose (EL-DIN et al., 2006).

Sendo assim e diante da preocupação em relação ao desenvolvimento de resistência ao único fármaco utilizado para o tratamento da infecção, tornou-se pertinente avaliar os efeitos dos derivados do eugenol sobre os vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e elucidar através de diferentes ferramentas morfológicas, bioquímicas e no contexto *in silico*, seu mecanismo de ação.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 DOENÇAS TROPICAIS NEGLIGENCIADAS

As doenças tropicais negligenciadas são um grupo de condições clínicas que persistem entre as populações de baixa renda nas regiões em desenvolvimento, sobretudo na África, Ásia e Américas. Elas são causadas por uma variedade de patógenos, como vírus, bactérias, protozoários e helmintos (WHO, 2018).

As doenças tropicais negligenciadas mais importantes incluem três infecções por protozoários transmitidos por vetores - leishmaniose, tripanossomíase humana africana e doença de Chagas; três infecções bacterianas - tracoma, lepra e úlcera de Buruli; e cinco infecções por helmintos - ancilostomíase, ascaridíase, tricuriase, oncocercose e esquistossomose (HOTEZ, 2006). Ao contrário das ameaças globais de saúde mais conhecidas, como o HIV-AIDS, a malária e a tuberculose, as DTNs não recebem atenção internacional suficiente. Em vez disso, elas continuam neste ciclo de isolamento e pobreza intensa, configurando o contexto de doenças negligenciadas (MOLYNEUX, 2004).

Como característica comum, as DTNs incluem alta endemicidade em áreas urbano-rurais e empobrecidas de países de baixa renda e uma capacidade de prejudicar o crescimento infantil, o desenvolvimento intelectual e a educação, bem como a produtividade do trabalhador. Desta forma, as doenças tropicais negligenciadas são condições de promoção da pobreza. Muitas das doenças tropicais negligenciadas são desfigurantes e estigmatizantes, sendo que suas características são descritas na Bíblia e em outros textos antigos, afirmando que elas afetaram os seres humanos por milênios (HOTEZ, 2006).

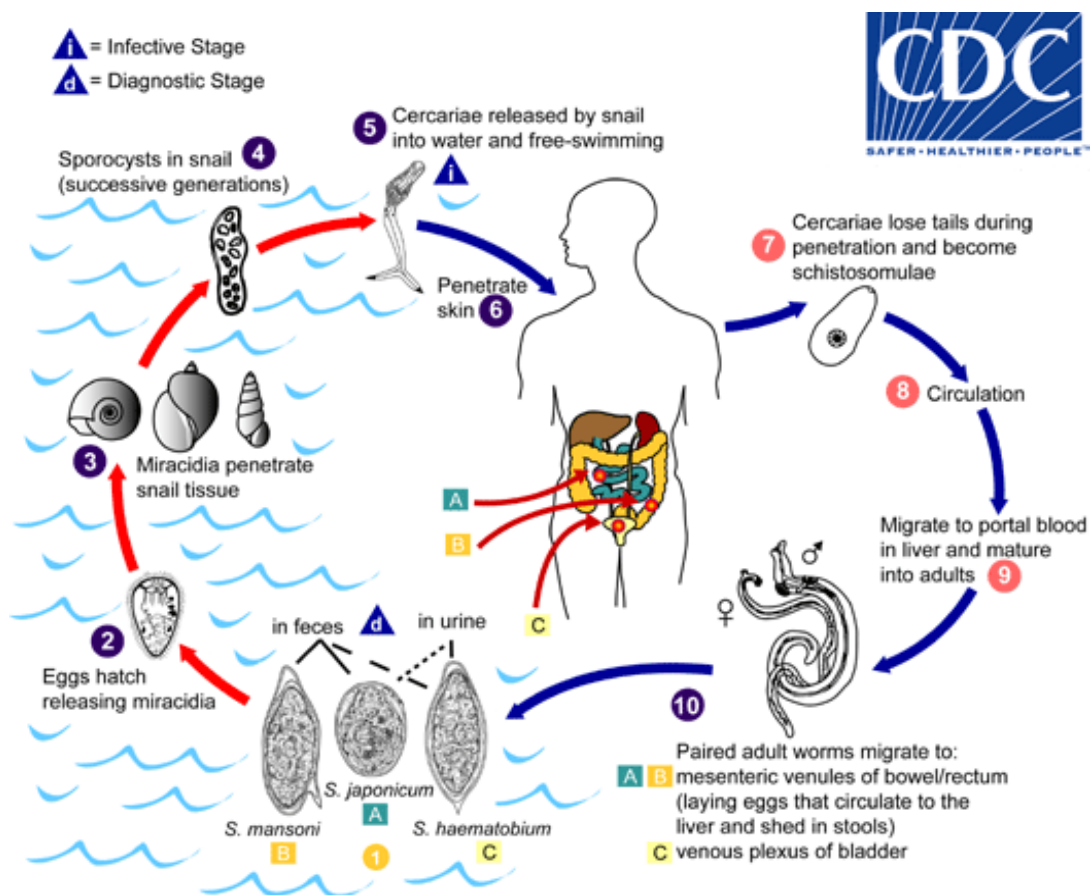
### 2.2 PARASITO – CICLO E TRANSMISSÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária aguda e crônica causada por vermes sanguíneos (trematódeos) do gênero *Schistosoma* (WHO, 2018). O ciclo de vida deste parasita ocorre em dois momentos – um no hospedeiro definitivo



(vertebrado) e outro no hospedeiro intermediário (invertebrado). No hospedeiro definitivo é que acontece a maturação e reprodução sexuada dos vermes, enquanto que no hospedeiro intermediário – caramujos do gênero *Biomplalaria* – ocorre a poliembrionia. Existe, portanto, seis estágios pelos quais o parasita passa durante seu ciclo de vida, sendo eles: ovo, miracídio, esporocistos, cercária, esquistossômulo e vermes adultos (HAN et al., 2009).

Os vermes machos e fêmeas adultos vivem nas veias do hospedeiro humano, onde acasalam e produzem ovos, os quais são eliminados com fezes ou urina<sup>1</sup> (FIGURA 1). Sob condições ideais, os miracídios eclodem<sup>2</sup>, nadam e penetram caramujos específicos que são os hospedeiros intermediários<sup>3</sup>. Os estágios larvais do parasito no caramujo incluem duas gerações de esporocistos<sup>4</sup> e a produção de cercárias<sup>5</sup>. Após a liberação do caramujo, as cercárias infectantes nadam, penetram na pele do hospedeiro humano<sup>6</sup> e perdem sua cauda bifurcada, tornando-se esquistossômulos<sup>7</sup>. Os esquistossômulos migram através de vários tecidos e fases até a seu habitat nas veias<sup>8-9</sup>. Os vermes adultos em humanos residem nas vênulas mesentéricas em vários locais, que às vezes parecem ser específicos para cada espécie<sup>10</sup>. Por exemplo, o *S. japonicum* é mais frequentemente encontrado nas veias mesentéricas superiores que drenam o intestino delgado<sup>A</sup>. Por outro lado, o *S. mansoni* ocorre mais frequentemente nas veias mesentéricas superiores que drenam o intestino grosso<sup>B</sup>. Ambas as espécies, no entanto, podem ocupar qualquer localidade e são capazes de se movimentar entre diferentes locais, de modo que não é possível afirmar inequivocamente que uma espécie só ocorre em um local. O *S. haematobium* ocorre mais frequentemente no plexo venoso da bexiga<sup>C</sup>, mas também pode ser encontrado nas vênulas retais. As fêmeas (tamanho 7 a 20 mm; machos ligeiramente menores) depositam ovos nas pequenas vênulas dos sistemas porta. Os ovos são movidos progressivamente em direção ao lúmen do intestino (*S. mansoni* e *S. japonicum*), da bexiga e ureteres (*S. haematobium*), e são eliminados com fezes ou urina, respectivamente (CDC, 2018).

Figura 1 - Ciclo de vida do *Schistosoma*

Fonte: Centers for Disease Control and Prevention, 2017.

### 2.3 EPIDEMIOLOGIA

O gênero *Schistosoma* está bem estabelecido no mundo todo, sendo as espécies *Schistosoma japonicum* distribuído na China, Filipinas e Indonésia; *S. mansoni* em muitos países da África e América do Sul; e *S. haematobium* distribuído na África e no Oriente Médio (TABELA 1) (KOJIMA, 1997).

Apesar de *S. haematobium*, *S. mansoni*, *S. guineensis* e *S. intercalatum* infectaram majoritariamente seres humanos, *S. japonicum* e *S. mekongi* são espécies zoonóticas. De fato, mais de 40 espécies diferentes de mamíferos servem como hospedeiros de reservatórios para *S. japonicum*, com bovinos (búfalo e gado) sendo o mais relevante (ZHOU et al., 2010). Por outro lado, os principais hospedeiros reservatórios para *S. mekongi* parecem ser cães e porcos domésticos, mas outros

animais, nomeadamente bovinos, podem também estar envolvidos na transmissão (MUTH et al., 2010). Gentile et al. (2010), demonstraram a importância de hospedeiros reservatórios do *S. mansoni* e a preocupante ideia da potencialização da transmissão da esquistossomose nas áreas endêmicas através de roedores suscetíveis a infecção.

Tabela 1 - Espécies de parasitos e distribuição geográfica da esquistossomose

<b>Espécies de parasitos e distribuição geográfica da esquistossomose</b>		
	<b>Espécies</b>	<b>Distribuição geográfica</b>
<b>Esquistossomose intestinal</b>	<i>Schistosoma mansoni</i>	África, Oriente Médio, Caribe, Brasil, Venezuela e Suriname
	<i>Schistosoma japonicum</i>	China, Indonésia, Filipinas
	<i>Schistosoma mekongi</i>	Vários distritos do Camboja e da República Democrática Popular do Laos
	<i>Schistosoma guineensis</i> e <i>S. intercalatum</i> relacionados	Áreas de floresta tropical da África Central
<b>Esquistossomose urogenital</b>	<i>Schistosoma haematobium</i>	Oriente Médio, África, Córsega (França).

Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde, 2019.

Há de se mencionar como característica pontual da epidemiologia da esquistossomose, sua distribuição focal. Em outras palavras, sua intensidade e prevalência demasiadamente variáveis. A ausência de saneamento básico, falta de água limpa e higiene, além de atividades que envolvam o contato com a água são fatores eminentes que colocam os indivíduos em risco de infecção pela esquistossomose quando expostos a coleções aquáticas contaminados (GRIMES et al., 2014).

Estimativas mostram que no ano de 2016, pelo menos 206,4 milhões de pessoas necessitaram de tratamento. O tratamento, que deve ser repetido ao longo de vários anos, reduzirá e prevenirá a morbidade. A transmissão da esquistossomose

foi relatada em 78 países. No entanto, a quimioterapia preventiva para a esquistossomose, onde pessoas e comunidades são alvos de tratamento em larga escala, só é necessária em 52 países endêmicos com transmissão de moderada a alta (WHO, 2018). Embora a estimativa do número de pessoas infectadas seja de aproximadamente 200 milhões de pessoas, os números relativos à morbidade e a mortalidade não estão bem estabelecidos, devendo, portanto, ser revisados (BERGQUIST, 2002).

## 2.4 CONTROLE E TRATAMENTO

O controle da esquistossomose ocorre principalmente pela quimioterapia preventiva, sendo que crianças em idade escolar e outros grupos de alto risco podem receber o praziquantel (PZQ) sem diagnóstico prévio (UTZINGER et al., 2011).

O Ministério da Saúde preconiza a respeito do controle duradouro e sustentável da esquistossomose, a implementação de políticas públicas que melhorem as condições de vida das populações. Para tanto:

“os gestores municipais do Sistema Único de Saúde – SUS, responsáveis pela execução das ações de vigilância e controle da esquistossomose, devem buscar, em articulação com outros setores governamentais, a melhoria de vida das populações, mediante ações de educação e de intervenção no meio ambiente” (BRASIL, 2014).

O tratamento, por sua vez, deve ser repetido ao longo de vários anos e assim, espera-se uma redução do número de infectados e a prevenção da morbidade (WHO, 2018). A estratégia da Organização Mundial de Saúde (OMS) para o controle da esquistossomose se concentra no controle da morbidade da doença por meio de tratamento periódico e direcionado com o PZQ. Isso envolve tratamento regular de todos os que estão em risco (WHO, 2018).

Não obstante, o uso extensivo de PZQ na ausência de alternativas necessita de monitoramento cuidadoso para identificar sinais precoces de falha terapêutica

(DOENHOFF et al., 2009). Assim, a OMS percebeu a exigência de detectar novas alternativas além do PZQ.

Tratar indivíduos infectados com o PZQ, droga anti-helmíntica, controla a infecção e morbidade (WHO, 2002). O PZQ, um derivado de pirazinoisoquinolina altamente eficaz, com um bom perfil de segurança e um amplo espectro contra infecções por helmintos, continua a ser o medicamento de escolha para a quimioterapia da esquistossomose há mais de 40 anos. No entanto, em áreas endêmicas, a possibilidade de os parasitos desenvolverem resistência ao PZQ é consideravelmente preocupante, principalmente quando se leva em conta que ele é o único fármaco disponível para esta parasitose. Assim sendo, o avanço e melhoria no tratamento da esquistossomose são emergentes (DOENHOFF, 2008).

A alta eficácia contra todas as espécies de *Schistosoma*, a ausência de efeitos colaterais sérios, a administração de dose oral única, o custo competitivo e a larga experiência clínica mostrando que ele é seguro, efetivo e fácil de administrar, fizeram do PZQ o medicamento de escolha no combate a esquistossomose (THOMPSON et al., 1982).

O mecanismo de ação do PZQ está relacionado ao influxo de cálcio através do tegumento e das células musculares do *Schistosoma* causando contrações imediatas, devido aos sítios no tegumento do verme que são sensíveis ao PZQ. Como o tegumento está ligado às células do músculo, uma elevação de cálcio intrategumentar conduz a um aumento do cálcio no retículo sarcoplasmático, promovendo assim a referida contração muscular (CIOLI et al., 2014).

Outros fatores observados sobre a ação da droga foram alterações morfológicas como vacuolização do sincício tegumentar e a formação de bolhas na superfície do tegumento. Com a formação dessas lesões no tegumento, ocorre a exposição de antígenos do parasito e a consequente penetração de células de defesa em seu interior que auxiliam na destruição dos vermes. Este fato é decorrente do sinergismo entre a ação dos anticorpos e o PZQ (XIAO et al., 1984).

Há uma falta de dados de testes de segurança para o uso de PZQ em crianças com menos de quatro anos de idade ou mulheres grávidas. No entanto, o PZQ foi amplamente distribuído em programas de administração de medicamentos em massa e a OMS agora recomenda que as mulheres grávidas devam ser tratadas como parte

dessas campanhas com base na vasta experiência com a droga e na revisão das evidências veterinárias e humanas. Da mesma forma, a OMS relata que há evidências crescentes de que crianças infectadas a partir de um ano de idade podem ser efetivamente tratadas com PZQ sem efeitos colaterais graves; no entanto, a droga está comumente disponível na forma de pílulas grandes e difíceis de engolir, o que coloca crianças pequenas em risco de asfixia e outras dificuldades para engolir o fármaco (CDC, 2018).

## 2.5 DIFICULDADES NO TRATAMENTO ATUAL

Desde o desaparecimento da oxamniquine e metrifonato, o PZQ tem sido o único fármaco de escolha para tratamento da esquistossomose. É preocupante, no entanto, um único medicamento disponível para uma das mais importantes doenças do mundo tropical. Os trabalhadores de campo e a comunidade científica lamentam a falta de interesse pela indústria farmacêutica no desenvolvimento de novas alternativas (BERGQUIST, 2002).

Embora a esquistossomose seja uma infecção tratável, o atual tratamento de escolha não fornece uma estratégia ideal para o controle da doença, pois altas taxas de reinfecção pós-tratamento, o declínio da eficácia com tratamento repetido, a morbidade de rebote (no caso da esquistossomose) e o potencial para o surgimento de resistência a drogas ameaçam a sustentabilidade da administração de medicamentos em massa como única forma de controle (HOTEZ, 2008).

Tendo em vista as problemáticas que envolvem a esquistossomose, há três fatores básicos que justificam a necessidade da descoberta e desenvolvimento de medicamentos contra essa doença. Primeiramente, não existe uma vacina disponível para a prevenção da esquistossomose e os recursos necessários para o desenvolvimento de vacinas eficazes são substanciais. Em segundo lugar, há desafios operacionais e limitações de recursos em relação à implementação de outras medidas preventivas, como acesso à água potável e saneamento adequado. Por último e não menos importante, o comportamento humano e os hábitos e estilo de

vida (por exemplo, evitar contato com a água para evitar a transmissão da esquistossomose) são de difícil alteração (LOUKAS, 2006).

Sendo assim, o uso de medicamentos seguros e eficazes são a principal estratégia para o tratamento individual e o controle da morbidade comunitária da esquistossomose (UTZINGER, 2004). O desenvolvimento e a implantação de novos medicamentos, isoladamente ou em combinação com outros que têm um mecanismo de ação diferente, é um fator-chave para melhorar os resultados terapêuticos e prolongar a vida útil dos medicamentos existentes (WHITE, 1999).

## 2.6 ALVOS CARACTERÍSTICOS PARA NOVOS MEDICAMENTOS

### 2.6.1 Tegumento

Os esquistossomos pertencem ao clado animal chamado neodermata, que consiste em aproximadamente 100.000 espécies de vermes parasitos (LITTLEWOOD, 2006). A principal inovação evolucionária que define esse clado é uma estrutura semelhante à da pele - denominada tegumento - que permite que os parasitos suportem ambientes particularmente hostis, como o sistema digestivo humano e a corrente sanguínea. Também ajuda os vermes a absorver nutrientes e a se apegar a seus hospedeiros, adaptações importantes que potencialmente permitiram que os vermes se tornassem parasitos (ADLER, 2018).

Balkom et al. (2005), mapearam o proteoma tegumentar da estrutura da superfície externa de *S. mansoni* a partir do projeto de sequenciamento do genoma deste helminto. A partir daí, foi possível identificar 740 proteínas das quais 43 eram específicas do tegumento. Muitas destas proteínas não apresentavam homologia com nenhuma proteína não esquistossômica, demonstrando que a superfície externa do esquistossomo compreende proteínas específicas e a únicas, provavelmente críticas para a sobrevivência do parasita.

O tegumento é capaz de secretar e expor substâncias que influenciam na resposta do hospedeiro. Estas substâncias são capazes de mimetizar antígenos do indivíduo, refratando a resposta imune (VAN HELLEMOND et al., 2006). Uma outra característica que classifica o tegumento do *S. mansoni* como um mecanismo de

evasão extremamente efetivo, é uma renovação muito rápida, principalmente em áreas danificadas, sendo, também, recoberto por proteínas que degradam imunoglobulinas e não permitem a aderência de granulócitos (ABATH e WERKHAUSER, 1996; VAN HELLEMOND et al., 2006).

Esta estrutura sincicial desempenha um papel crucial na proteção, absorção de nutrientes, incluindo aminoácidos, lipídios, lipoproteínas e outros, juntamente com a excreção de produtos catabólicos, como o ácido láctico (FAGHIRI, 2015).

#### 2.6.1.1 Marcação do tegumento no verme adulto

Nos últimos anos, o sistema excretor e o tegumento de *S. mansoni* foram alvos importantes para o desenvolvimento de drogas. Tendo em vista isto, se constitui como uma ferramenta sensível para identificação de lesões tegumentares em *S. mansoni* a sonda fluorescente Hoechst 33258 (OLIVEIRA et al. 2006). Esta sonda já foi utilizada em vários estudos, não somente em vermes adultos (LIMA et al. 1994; OLIVEIRA et al. 2006), mas também em esquistossômulos (KUSEL et al. 2007), esporocistos (MATTOS et al. 2006), e cercárias (THORNHILL et al. 2009). Portanto, em diferentes estágios de vida do *S. mansoni*.

A análise da integridade do tegumento dos vermes de *S. mansoni* utilizando marcadores fluorescentes pode ser classificada como um método qualitativo. Assim, após a exposição à substância testada, a integridade da membrana pode ser avaliada usando a sonda Hoechst 33258, que é um marcador de DNA específico. A ação desta sonda, por sua vez, se dá quando a mesma se difunde para o interior da célula quando há lesões, atuando como um indicador de integridade da membrana (OLIVEIRA et al., 2006).

De acordo com Couto et al., (2010) a sonda Hoechst 33258 (bis benzamida) (2,4 hidroxifenil 5, 4 metil, 1 piperazina 2,5 bi H-benzimidazol) é uma sonda hidrofílica, que se torna fluorescente somente quando se liga ao DNA após difusão nas células subtegumentares onde existem lesões tegumentares, agindo assim como um indicador da integridade da membrana.

#### 2.6.2 Sistema excretor



Como dito anteriormente, o sistema excretor e o tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* são alvos característicos para o desenvolvimento de novas drogas. Para se obter informações sobre a biologia de *S. mansoni*, estudos para medir a atividade do sistema excretor, como sinalização transmembrana e secreção de metabólitos, são realizados através de métodos sensíveis, como técnicas de microscopia de fluorescência, usando marcadores específicos, tornando-se um alvo atraente para novos testes de drogas (SATO, 2004).

Considerando a importância de compreender os aspectos bioquímicos e de sobrevivência de *S. mansoni* por meio de seus processos metabólicos (químicos e/ou fisiológicos), é possível direcionar o estudo para alvos específicos, como o sistema excretor, para rastrear novos fármacos (MESSERLI, 2009). De acordo com Greenberg (2014), a atividade do sistema excretor de *S. mansoni* é mediada por um produto da proteína de transporte, glicoproteína P (Pgp) do gene MDR2 - localizado nas células epiteliais do parasita. A expressão e atividade da Pgp em células de diversos organismos, está relacionada a estímulos endógenos e ambientais, como drogas, agentes citotóxicos e choque térmico, capaz de induzir "estresse" celular, aumentando os níveis de expressão dessa proteína (GREENBERG, 2014).

#### 2.6.2.1 Marcação do sistema excretor no verme adulto

A partir de um estudo de Sato et al. (2002), foi possível demonstrar que a resorufina é um substrato da glicoproteína P e que a extensão de sua acumulação pelo sistema excretor poderia ser usada como medida de excreção da atividade do sistema excretor. A resorufina é, portanto, um sal sódico (7-hidroxi 3-fenoxazina) de natureza fluorescente e um modulador/substrato da glicoproteína P (Pgp), sendo esta responsável por bombear o substrato resorufina.

### 2.7 FERRAMENTAS QUE AUXILIAM O ENTENDIMENTO DO MECANISMO DE AÇÃO DE SUBSTÂNCIAS E O *Schistosoma mansoni*

Uma curiosidade sobre o *S. mansoni* é que ele foi o primeiro Trematoda a ser estudado por microscopia eletrônica, em 1955. Apesar disso, o parasito continua ainda hoje sendo analisado sob diferentes perspectivas (HOCKLEY, 1973).

O mecanismo de ação do PZQ foi elucidado através de técnicas microscópicas, onde tem sido demonstradas alterações no tegumento, como deformações locais com descamação, erosão, perda de espinhos e formação de bolhas (RIAD et al., 2009). A superfície do tegumento do *S. mansoni* já foi destrinchada por Miller et al. (1972), por meio da microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde o autor observou os tubérculos do tegumento e os espinhos presentes em grande parte da superfície do corpo.

Xavier et al. (2010) recentemente demonstraram que o tegumento dos parasitos pode ser um importante alvo de estudo, uma vez que seu desenvolvimento e função apresentam capacidade de regulação de acordo com o sistema imune de cada hospedeiro (XAVIER et al., 2010). Sendo assim, o estudo morfológico comparativo por diferentes tipos de microscopia de vermes adultos de *S. mansoni* dará subsídios para o melhor conhecimento da ultraestrutura destes parasitos com especial enfoque no tegumento e sistema excretor, que por sua vez, constituem um alvo para estudos com anti-helmínticos.

Por outro lado, já existem diversos usos de ferramentas computacionais em pesquisas que envolvem o *S. mansoni*, como exemplo na elucidação de estruturas presentes no transcriptoma do trematódeo (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2015; LEOW et al., 2015), permitindo detecção de alvos para protótipos de vacinas (PINHEIRO et al., 2011) e testes de *docking* avaliando possíveis ligantes com atividade inibitória sobre enzimas fundamentais ao parasito (GABA et al., 2014). Desta forma, a análise *in silico por docking molecular*, se caracteriza como uma ferramenta interessante para elucidar o mecanismo de ação das substâncias com atividade esquistossomicida, pois é capaz de avaliar a interação das drogas e os alvos bioquímicos.

## 2.8 CONTROLE DA MOTILIDADE NO VERME ADULTO

### 2.8.1 Canais de cálcio

É habitual denominar o íon cálcio como o íon da vida e da morte. Isto porque o mesmo está envolvido em processos como a fertilização e a apoptose, além de uma gama de funções exercidas nos sistemas biológicos. Este íon possui uma distribuição assimétrica e apresenta um gradiente eletroquímico considerável por meio de membranas celulares, plasmáticas ou intracelulares. Quando de sua utilização como sinalizador de processos ao ser carregado, a favor do gradiente e através de canais específicos, este fato é biologicamente aproveitado. Neste contexto, situam-se os canais de cálcio ativados por voltagem, que por sua vez, respondem a variações no campo elétrico, presente através da membrana plasmática, com mudanças em sua conformação que os leva a transitar entre os estados aberto e fechado, determinando, desta forma, a permeabilidade a esse íon (CORSSO et al., 2012).

Os canais de cálcio dependentes de voltagem (Voltage Operated Calcium Channels – VOCC) que estão na membrana plasmática, são responsáveis por intermediar a entrada de cálcio como *feedback* à despolarização, o que por sua vez, permite o acoplamento entre as modificações do potencial de membranas e outros eventos celulares, como por exemplo a contração muscular (CORSSO, COSTA e VARANDA, 2012). Os canais de cálcio ativados por voltagem são divididos eletrofisiologicamente em 2 grupos: aqueles ativados por altas voltagens que requerem grandes despolarizações para abrirem (HVA, do inglês, *high voltage activated*; tipo L, N, P, Q e R); e aqueles ativados por baixas voltagens (LVA, do inglês, *low voltage activated*; tipo T) (SPEDDING e PAOLETTI, 1992).

Desde os meados dos anos 70, o tratamento da hipertensão arterial se dá via antagonistas de canais de cálcio. Estes se constituem como um conjunto heterogêneo de drogas, sendo que, atualmente, são divididos em quatro diferentes famílias:

- i. Derivados das diidropiridinas
- ii. Derivados dos benzotiazepínicos
- iii. Derivados das fenilalquilaminas

#### iv. Derivados do tetralol

No primeiro grupo, pode-se citar como exemplo a nifedipina, a felodipina, a lacidipina e amlodipina. No segundo grupo, tem-se o diltiazem, enquanto no terceiro temos o verapamil e por último o mebendazol (PITT, 1997).

Em muitas células excitáveis, a entrada de íons de cálcio pode ser inibida pelo verapamil, diltiazem e dihidropiridinas, tais como nifedipina ou nitrendipina. Estas drogas são frequentemente agrupadas como “antagonistas de  $Ca^{2+}$ ” ou “bloqueadores do canal de  $Ca^{2+}$ ” embora elas representem classes bastante diversas de compostos orgânicos. Como agentes terapêuticos, elas demonstram ser bastante eficazes no controle de arritmias cardíacas e doença coronariana (LEE e TSIEN, 1983).

As dihidropiridinas de o verapamil são bloqueadores conhecidos dos canais de cálcio do tipo L, predominante na musculatura lisa em vertebrados. Outros canais, no entanto, são indiferentes a estas moléculas, porém, podem ser bloqueados por diversas outras toxinas (NOËL et al., 2001).

Fetterer et al. (1980) demonstraram indicativos da relação dos VOCCs em relação ao controle da musculatura somática em esquistossomas e outros platelmintos. De acordo com os autores, altas concentrações de  $K^+$  extracelular produziram a despolarização, que por sua vez induziram a contração muscular de vermes *in vitro*, sendo que este efeito foi impossibilitado pelas dihidropiridinas.

Em relação a este modelo experimental, no entanto, ocorre a impossibilidade de discernir o meio pelo qual este mecanismo ocorre: se pela despolarização que induz diretamente um influxo de cálcio na célula muscular ou se pela resposta intermediada pela liberação pré-sináptica de algum neurotransmissor. Baseado no fato de que a despolarização produz também a contração de fibras musculares isoladas, tem-se a hipótese de que a abertura dos VOCCs é devida a despolarização, o que acarreta, por conseguinte, no influxo de cálcio extracelular. Esta interpretação é respaldada com maior credibilidade pela ação da dihidropiridina nicardipina, que bloqueia este efeito (DAY et al., 1994; DAY et al., 2000).

Dados sustentados pela biologia molecular, comprovam que o *S. mansoni* possui VOCCs, uma vez que três cDNAs de subunidade  $\alpha 1$  de canais de cálcio

ativados por alta voltagem foram clonados (KOHN et al., 2001), sendo um do tipo L e sensível às diidropiridinas.

A ausência de cálcio externo ou a presença do bloqueador deste íon (verapamil) impedem o efeito contrativo do PZQ sobre o verme adulto de *S. mansoni* *in vitro* (DA SILVA e NOËL, 1995). Este fato é, por sua vez, atribuído à subunidade  $\beta$  do canal de cálcio do tipo L (que induz a abertura do mesmo) (KOHN et al., 2003). Portanto, farmacologicamente, o PZQ possui como receptor o canal de cálcio do tipo L, ao menos quando se trata do seu efeito sobre a musculatura do verme.

### 2.8.2 Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> - ATPase

Skou (1957), descobriu há aproximadamente 60 anos atrás, a máquina molecular para bombear Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> através da membrana celular, também conhecida como Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> - ATPase. No prelúdio dos anos 70, foram feitos inúmeros estudos elucidando os mecanismos de ação da ouabaína – um bloqueador da Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> - ATPase - na expressão gênica e no crescimento celular. Naquele tempo, estes mecanismos, em sua maioria, foram conferidos ao bloqueio da bomba e à alteração da quantificação do íon intracelularmente (QUASTEL e KAPLAN, 1968).

A Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> - ATPase está presente em praticamente todas as células do reino animal. Ela é uma enzima transmembrana que faz uso da energia oriunda da quebra de ATP. Assim, ela transporta contra seus gradientes eletroquímicos dois íons K<sup>+</sup> para dentro da célula e três íons Na<sup>+</sup> para fora da célula. Desta maneira, a “bomba de sódio” é responsável pela manutenção dos gradientes iônicos, que são importantes em várias funções dentro da célula, tais como a extrusão de cálcio citossólico através da troca Na<sup>+</sup> Ca<sup>2+</sup> e a manutenção do potencial de membrana (SWEADNER, 1989).

Nechay et al. (1980) foram pioneiros em demonstrar a presença da enzima Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> - ATPase em *S. mansoni*. Estes autores identificaram em um homogeneizado de verme adulto, uma sucinta atividade ATPásica estimulada por sódio e bloqueada por ouabaína. Mais tarde, Fetterer et al. (1981), levantaram a hipótese de que esta enzima possuía papel preponderante na contração muscular e na manutenção do potencial de membrana tegumentar. Esta hipótese foi sustentada pela despolarização do

tegumento e contração intensa da musculatura somática provocadas pela ouabaína, inibidor seletivo da  $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$ .

As propriedades bioquímicas da  $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$  em relação ao *S. mansoni* foram melhor detalhadas a partir do ano de 1986. Assim, Noël e Pardon (1989) mostraram que, do contrário do que se pensava, haviam certas diferenças da enzima de mamífero e do parasito. Farmacologicamente, estes autores viram que a enzima do parasito era mais resistente à um inibidor de ATPases do tipo P (o vanadato), e à um inibidor específico de  $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPases}$  (a ouabaína). Nesta ocasião, detectou-se uma diferença no tegumento do verme referente a sensibilidade entre as atividades presentes (NOËL e SOARES, 1986), o que apontava para a possibilidade de haver ao menos duas isoformas de  $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$  em *S. mansoni*, como acontece em mamíferos (SWEADNER, 1989).

## 2.9 EUGENOL E SEU POTENCIAL NO TRATAMENTO DE PARASIToses

Temos conhecimento que os seres humanos usam plantas há milhares de anos para tratar doenças e distúrbios de saúde. É provável também que muitas destas plantas já foram identificadas e usadas como antiparasitárias. Ainda hoje as infecções por parasitos são tratadas muitas vezes por produtos vegetais ou metabólitos secundários isolados a partir deles (WINK, 2012).

Na literatura já foram relatadas algumas competências do eugenol, tais como atividades antibacterianas (BURT e REINDERS, 2003) e antitripanossomais (SANTORO et al., 2007). Os extratos de flores em botão de *Syzygium aromaticum* foram relatados por mostrar a eficácia antimalárica (BAGAVAN et al., 2011). Além disso, estudos recentes demonstraram que o eugenol possui potencial imunoterapêutico na leishmaniose visceral experimental (ISLAMUDDIN et al., 2016). Morais et al., confirmaram a atividade anti-*Leishmania* tanto *in vitro* como *in vivo* de derivados do eugenol (MORAIS et al., 2014).

El-Din et al. (2006), demonstraram que o eugenol apresenta considerável efeito moluscicida contra *Biomphalaria alexandrina* e *Bulinus truncatus*, vetores da esquistossomose, mais especificamente *S. mansoni* e *S. haematobium*,

respectivamente. Grecco (2016), demonstrou que o desidrodieugenol isolado de *Nectandra leucantha* (Lauraceae) possui potencial terapêutico contra *T. cruzi*. Ensaios biológicos realizados com helmintos utilizando derivados do eugenol trouxeram alguns aspectos sobre o mecanismo de ação destes compostos.

Óleos essenciais foram isolados de *Eucalyptus globulus* e *Ocimum gratissimum* tendo como os principais componentes o eugenol (43,7%) e 1,8-cineole (32,71%), *Croton zehntneri* e *Lippia sidoides* tendo como os principais componentes anetol e timol. A atividade nematicida de óleos essenciais extraídos destas plantas atingiu valores entre 94,5 e 100% e várias concentrações de óleos essenciais foram usadas no mesmo teste e modelo nematóide. Na concentração de 800 mg / kg, os óleos essenciais de *C. zehntneri* e *L. sidoides* foram 46,3% e 11,64% efetivos contra o nematódeo gastrintestinal de ovelhas *Haemonchus contortus*, indicando que o timol e o anetol são as substâncias ativas prováveis com mecanismos de ação diferentes em células nematoides (OLIVEIRA, 2009). Albuquerque et al. (1995) relataram que o óleo essencial e o anetol de *C. zehntneri* bloquearam as contrações musculares e reduziram a resposta do músculo à acetilcolina, implicando em locais de ação nas fibras musculares (ALBUQUERQUE, 1995).

### 2.9.1 Compostos eugenólicos e helmintos

O eugenol é um hidroxifenil propeno de ocorrência natural em óleos essenciais de diversas plantas, tais como as das famílias *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* e *Myrsicaceae*. Ele é um dos componentes majoritários do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry, *Myrtaceae*) e é muito usado na indústria cosmética e alimentícia. Há um vasto indicativo de que o eugenol possui efeitos biológicos benéficos ante a saúde humana, sendo estes elencados sobretudo a atividades antiinflamatórias e antioxidantes (MARCHESE et al., 2017).

O *H. contortus* é um nematoide altamente patogênico, que se alimenta do sangue de pequenos ruminantes, e causa significativa mortalidade no mundo todo (BESIER et al., 2016). Katiki et al. (2017), investigaram a interação mais eficaz entre óleos essenciais e determinaram a concentração letal 50% (CL50) do eugenol em

0,57, sendo essa a concentração intermediária dentre os óleos essenciais testados (KATIKI et al. 2017).

Em um modelo de nematóide (*Caenorhabditis elegans*), o óleo de cravo e o eugenol atenuaram a virulência da *Escherichia coli* enterro-hemorrágica (EHEC). O eugenol a 0,005% (v / v) inibiu marcadamente a formação de biofilme EHEC sem afetar o crescimento de células planctônicas. Além disso, três outros derivados do eugenol (isoeugenol, 2-metoxi-4-rilfenol e 4-etilguaiacol) apresentaram atividade antibiofilme, indicando que a unidade hidroxila C-1, a unidade metoxi C-2 e cadeia alquílica ou alceno C-4 no anel de benzeno do eugenol desempenham papel importante na atividade antibiofilme (KIM et al., 2016).

O eugenol (LC50 = 66,6 µg / ml) exibiu maior atividade nematicida contra *Meloidogyne incognita*, indicando que o óleo essencial das partes aéreas de *Agastache rugosa* e seus compostos constituintes têm potencial de desenvolvimento em nematicidas naturais para o controle do nematóide do nódulo radicular *M. incognita* (LI et al., 2013).

Abdel-Rahman et al. (2013), demonstraram a eficácia do efeito dependente da dose do eugenol utilizando o modelo nematóide *C. elegans* (ABDEL-RAHMAN, et al., 2013). Olounladé et al. (2012), analisaram a atividade de óleos essenciais de duas plantas usadas na medicina popular que possuíam atividade anti-helmíntica e, portanto poderiam ser usadas como medicamentos tradicionais aperfeiçoados ou, pelo menos, como aditivos alimentares em um tratamento combinado para o controle de infecções por *Strongyloides ratti* (OLOUNLADÉ et al., 2012).

Kumar et al. (2011) sugeriram que os moluscidas de origem vegetal poderiam ser utilizados com variados graus de sucesso na formulação de iscas a partir da combinação binária de carboidratos + aminoácidos (20 mM) com componente moluscicida ativo *Ferula asafoetida* (ácido ferúlico, umbeliferona), *Syzygium aromaticum* (eugenol), *Carum carvi* (limoneno) (KUMAR et al. 2011).

El-Kady et al. (2019), recentemente demonstraram o amplo efeito anti-inflamatório do eugenol sobre o *S. mansoni*. Para isso, determinou a expressão do marcador imuno-histoquímico sensível  $\alpha$ -actina do músculo liso ( $\alpha$ -SMA) em tecidos infectados com esquistossomos, além da análise de parâmetros parasitológicos, bioquímicos e histológicos. Segundo o estudo, o tratamento com eugenol mostrou



redução significativa na carga total de vermes em 19,2%, além da redução significativa dos níveis séricos das enzimas hepáticas: aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase. O exame histopatológico revelou uma redução significativa nos números e diâmetros dos granulomas hepáticos e o efeito antifibrótico do eugenol foi validado pela sua redução considerável na expressão do marcador sensível  $\alpha$ -SMA. Embora o eugenol não possa erradicar totalmente os vermes adultos de *S. mansoni*, a melhora significativa das enzimas hepáticas e da fibrose hepática potencializa o papel do eugenol como promissor antifibrótico e um agente anti-esquistossomótico complementar (EL-KADY et al, 2019).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar nos contextos *in silico* e *in vitro* a atividade esquistossomicida de derivados eugenólicos utilizando ferramentas bioquímicas e moleculares.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a triagem de 15 compostos derivados do eugenol para a atividade esquistossomicida no contexto *in vitro*;

- Determinar a dose efetiva de 50% (ED<sub>50</sub>) das substâncias-alvo em vermes adultos de *S. mansoni*;

- Avaliar os danos causados no sistema excretor e no tegumento do *S. mansoni* utilizando a sonda Resorufina e Hoechst 33258, respectivamente;

- Avaliar a atividade dos derivados eugenólicos através dos canais de Ca<sup>2+</sup> e da Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase por meio de métodos bioquímicos utilizando o verapamil e a ouabaína como antagonista, respectivamente;

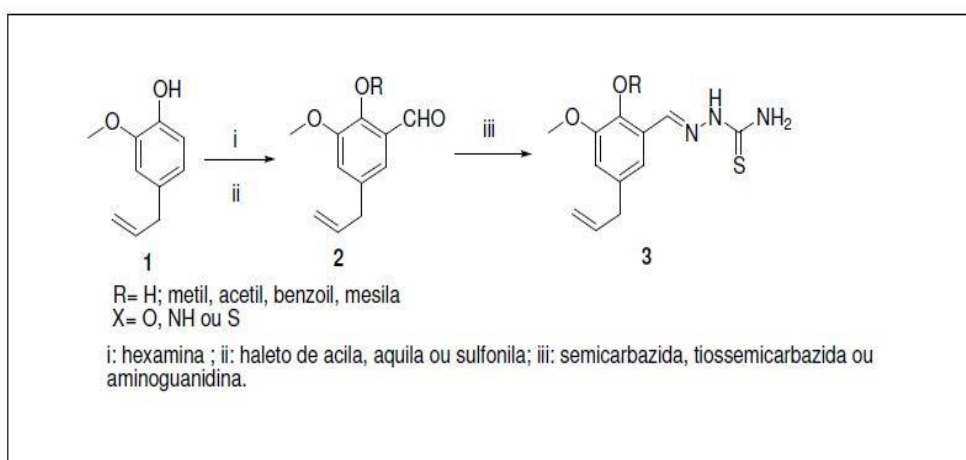
- Avaliar a atividade dos derivados eugenólicos nos alvos bomba Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase de *S. mansoni* por meio de análise *in silico*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 OBTENÇÃO DOS DERIVADOS

As reações para a obtenção dos derivados do eugenol foram realizadas segundo o esquema a seguir:

Figura 2 - Esquema proposto para a síntese do eugenol



Fonte: Laboratório de Fitoquímica, Unifal/MG.

### 4.2 ENSAIOS *IN VITRO*

#### 4.2.1 Parasitos

A cepa de *S. mansoni* isolada do paciente Luiz Evangelista (cepa LE) é rotineiramente mantida por passagens em série em modelos *Biomphalaria glabrata* e camundongos da linhagem *swiss*.

. Esta cepa vem sendo mantida durante mais de 40 anos no Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz. Os procedimentos realizados com os animais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/FIOCRUZ) e do CEUA da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG), com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL, registrada com o nº 25/2019 (Anexo A).

#### **4.2.2 Manutenção dos animais**

Camundongos *swiss*, fêmeas, de aproximadamente dois meses de idade, pesando em média 20 g, nascidos e criados no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz foram mantidos em caixas de polipropileno devidamente identificadas no biotério da Universidade Federal de Alfenas e alimentados com ração comercial *ad libitum* e água.

#### **4.2.3 Infecção dos animais**

Os camundongos foram inoculados no dorso, individualmente, por via subcutânea, segundo a técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968). Para evitar desproporção entre os esquistossomos machos e fêmeas recuperados, foram utilizadas cercárias provenientes de 50 ou mais caramujos infectados (PELLEGRINO et al., 1977). Este procedimento foi realizado no Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz.

#### **4.2.4 Recuperação dos vermes adultos**

No prazo de 45 a 60 dias de infecção, os camundongos foram eutanasiados por “overdose” de cloridrato de cetamina 10,0% (Cetamin - Syntec) e cloridrato de xilazina 2,0% (Xilazin – Syntec), na proporção de 2:1, administrado por via intraperitoneal ( $\pm$  0,2 ml). Os trematódeos adultos foram obtidos através da perfusão retrógrada do fígado, de acordo com o método de Smithers e Terry (1965). Ainda segundo este método, com a exposição do mesentério e do coração, a veia porta hepática foi seccionada na altura dos rins com agulha de grosso calibre conectada a uma seringa de 20 ml. Simultaneamente, na porção inferior do ventrículo esquerdo do coração foi injetado meio de cultura RPMI 1640, pH 7,4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) heparinizado (0,2%). Devido ao aumento da pressão nos vasos, o

sangue extravasou, levando consigo os vermes adultos, sendo coletados em uma placa de petri com RPMI heparinizado e suplementado com soro fetal bovino (5,0%).

#### **4.2.5 Avaliação dos derivados eugenólicos *in vitro***

Inicialmente foram realizados ensaios biológicos com o *S. mansoni* utilizando 15 diferentes derivados eugenólicos (FB1, FB2, FB3, FB4, FB5, FB6, FB7, FB8, FB9, FB10, FB11, FB12, FB13, FB14 e FB15) em diferentes concentrações. Por se tratar preliminarmente de um *screening*, estes compostos foram testados em altas doses, com menor intervalo entre elas, sendo, portanto, 150 µg/ml, 100 µg/ml, 75 µg/ml e 50 µg/ml.

Assim, os parasitos recuperados foram levados para capela de fluxo laminar, com o meio de cultura RPMI-1640 estéril e em seguida foram cultivados em placas de cultura de 24 poços (um casal por poço) em meio de cultura RPMI-1640 suplementado com 5,0% de soro fetal bovino inativado pelo calor e 1,0% de penicilina (10000,0 UI/ml) estreptomicina (10 mg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

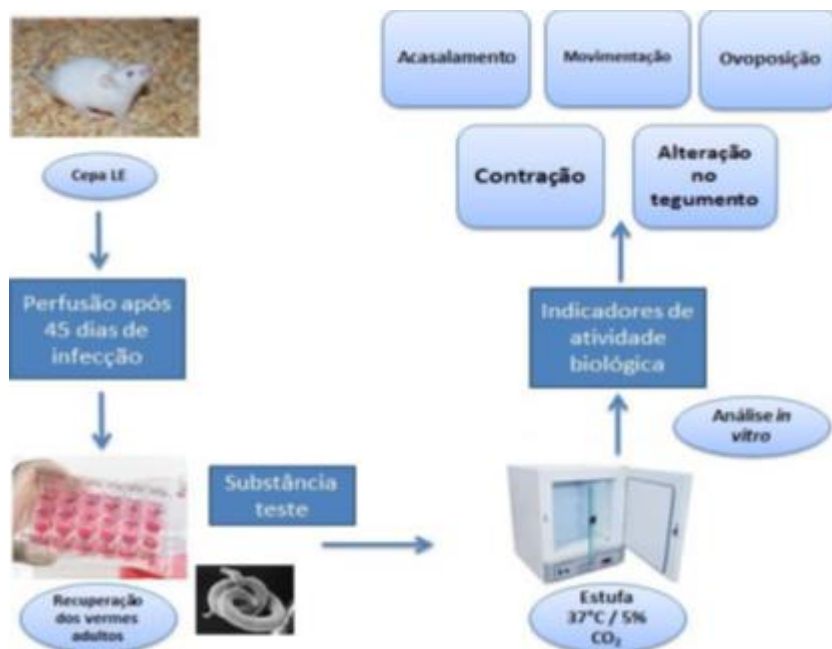
Feito isto, as amostras (derivados eugenólicos) foram adicionadas às culturas em diferentes concentrações. Como dito anteriormente, para se determinar as concentrações com melhor atividade, primeiramente foi feito um *screening* nas concentrações de 150,0; 100,0; 75,0; e 50,0 µg/ml.

Após adicionar os compostos, as placas de cultura foram levadas para estufa a 37°C e 5,0 % de CO<sub>2</sub>, e analisados após 2 horas e 24 horas em contato com as amostras. Após 24 horas os poços foram lavados, para retirar as amostras do contato com os parasitos, com a remoção do meio de cultura dos poços e acréscimo da mesma quantidade de meio estéril por 5 vezes (ou até perceber que os compostos foram retirados) (FIGURA 4).

Cada poço foi observado diariamente por sete dias para avaliar se os parasitos se recuperariam após retirá-los do contato com as amostras, comparando-os com os controles (nove poços foram usados para controle, um com o PZQ (2 µg/ml), o outro somente com o meio de cultura suplementado e o outro com o acréscimo do solvente

usado para dissolver as amostras, o metanol).

Figura 3 - Esquema da recuperação dos vermes adultos e dos ensaios *in vitro*.



Fonte: da autora

Foram utilizados como parâmetros de avaliação: acasalamento, movimentação, oviposição, contração e alterações de tegumento durante sete dias. Estes mesmos parâmetros, por sua vez, já foram usados em trabalhos anteriores como indicadores de atividade biológica e estudos de toxicidade com espécies de *Schistosoma* (CARRARA et al., 2013; CIOLI et al., 2014).

#### 4.2.6 Determinação da dose efetiva (ED<sub>50</sub>)

A determinação das doses efetivas para matar 50% dos vermes (ED<sub>50</sub>) dos vermes foi realizada com o auxílio do programa de computador GraphPadPrism (versão 5.0). Os parasitos foram avaliados e comparados com os controles quanto à quantidade de vermes acasalados, movimento, contração/encurtamento, morfologia, desprendimento de tegumento e oviposição. Todos os testes foram realizados em

triplicatas, e o PZQ foi utilizado como medicamento de referência. Assim, foram determinados o ED<sub>50</sub>, ED<sub>90</sub> e ED<sub>100</sub> dos derivados eugenólicos.

#### **4.2.7 Avaliação *in vitro* da atividade excretora e lesão de tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni* expostos aos derivados eugenólicos por meio de sondas fluorescentes**

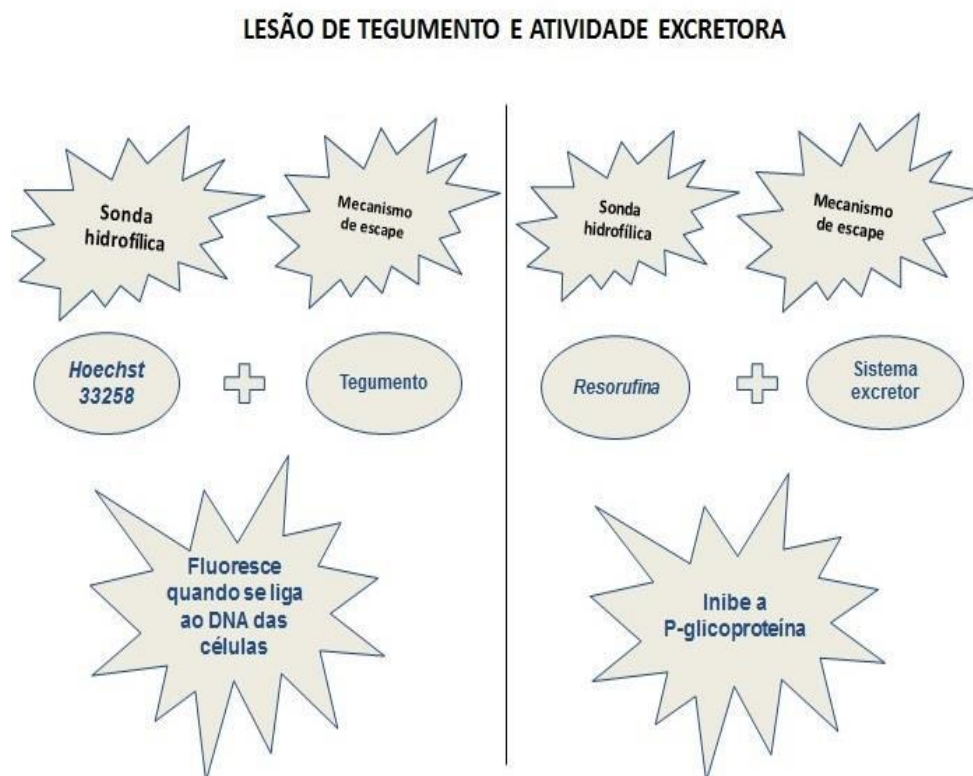
Para tentar elucidar o mecanismo de ação dos derivados eugenólicos, foi feita a avaliação no sistema excretor e no tegumento do parasito utilizando as sondas fluorescentes Resorufina e Hoechst 33258, respectivamente.

Assim, foi feita a marcação dos parasitos com as respectivas sondas fluorescentes e então avaliado o efeito dos derivados eugenólicos sobre o funcionamento do sistema excretor e sobre a camada superficial do tegumento do verme adulto de *S. mansoni*. Este procedimento foi realizado com o auxílio da técnica de microscopia de fluorescência.

A Resorufina é um sal sódico (7-hidroxi 3-fenoxazina), de natureza fluorescente e um modulador/substrato da P-glicoproteína (Pgp), utilizada por Sato et al. (2002).

A Hoechst 33258 (bis benzamida) (2,4 hidroxifenil 5,4 metil, 1 piperazina 2,5 bi H-benzimidazol) é uma sonda hidrofílica e fluoresce somente quando se liga ao DNA das células (COUTO et al., 2010) (FIGURA 4).

Figura 4 - Esquema da avaliação de alvos característicos para novos medicamentos - tegumento e sistema excretor - do *Schistosoma mansoni*



Fonte: da autora

#### 4.2.8 Avaliação da atividade do sistema excretor do verme adulto de *S. mansoni* exposto aos derivados eugenólicos após marcação com a sonda Resorufina

Foi realizado a perfusão para obtenção dos parasitos para uso nas técnicas de fluorescência (de acordo com o método de Smithers e Terry (1965), descrito anteriormente) e posteriormente à esta, os vermes adultos foram lavados e transferidos para placas de cultura de 24 poços (um casal por poço), contendo meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 5,0 % (v/v) de soro fetal bovino (SBF) (Gibco Limited, Paisley, Scotland) inativado pelo calor e 1,0 % de penicilina (10000,0 UI/ml) estreptomicina / (10 mg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).



Foi adicionado em cada poço 10,0 µL de resorufina (solução estoque a 10 mg/ml), e posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5,0 % CO<sub>2</sub> por 30 minutos. Após este período, foram adicionados nos poços 25,0 µL de metanol, PZQ (2 µg/ml), FB1, FB4 e FB9 com seus respectivos ED<sub>100</sub>, sendo que um dos poços conteve apenas o meio de cultura RPMI-1640 suplementado. Estas placas foram novamente incubadas por 15 minutos, nas mesmas condições anteriores. Ao final deste período, os parasitos foram lavados 5 vezes com meio de RPMI-1640 suplementado. Esses testes foram feitos em triplicatas e preparados para a visualização no microscópio de fluorescência.

#### **4.2.9 Avaliação do dano causado ao tegumento do verme adulto de *S. mansoni* exposto aos derivados eugenólicos após marcação com a sonda Hoechst 33258**

Posteriormente a perfusão os parasitos foram colocados na placa e foram adicionados os derivados eugenólicos nos poços nas mesmas concentrações citadas acima, além dos controles. As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C com 5,0% CO<sub>2</sub> e então foi feita a lavagem dos poços como descrito anteriormente. Foram adicionados 10,0 µL da sonda Hoechst 33258 em cada poço, seguindo de incubação por 15 minutos. Após este período foi realizada a lavagem dos poços novamente e as lâminas foram preparadas para visualização no microscópio de fluorescência.

#### **4.2.10 Microscopia de fluorescência (preparo das lâminas para leitura)**

Ao final de cada experimento, os parasitos foram transferidos para lâminas delimitadas por pequenas quantidades de vaselina, a fim de evitar o extravasamento dos parasitos para fora da lâmina.

Os parasitos foram colocados nas lâminas com pequena quantidade de meio de cultura e em seguida, as lâminas foram observadas em microscópio óptico de fluorescência (Zeiss Axio Scope A1, software Axio Vision LE) utilizando filtro

Rodamina para Resorufina (excitação/emissão máxima da resorufina 571/585 nm) e DAP para Hoechst 33258 (excitação/emissão máxima da Hoechst 352/455 nm).

#### 4.2.11 Avaliação do dano tegumentar por Microscopia Eletrônica de Varredura induzido por derivados eugenólicos

A integridade tegumentar morfológica em vermes adultos de *S. mansoni* foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (DIAS et al., 2019). Após o teste de toxicidade, os vermes foram coletados e fixados por 24 h em formalina tamponada neutra a 10%. Os vermes desidratados em uma série de concentrações crescentes de etanol (50 a 99,5%) e em uma estufa a 60 °C por 12 h. Posteriormente, foram montados em suportes metálicos, cobertos com ouro (Modular Balzers Union FDU 010, SCA 010, Oerlikon Balzers, Balzers, Liechtenstein) e examinados usando um microscópio eletrônico de varredura (Leo 1430VP; Carl Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha) (SEQUETTO et al., 2014; DIAS et al., 2019). A análise da integridade tegumentar foi investigada em vermes tratados com cada derivado eugenólico (FB1, FB4 e FB9) em quatro concentrações diferentes, duas abaixo e duas acima da ED<sub>50</sub> (TABELA 2).

Tabela 2 – Doses utilizadas para Avaliação do dano tegumentar por MEV induzido por derivados eugenólicos

	D1	D2	ED <sub>50</sub>	D3	D4
<b>FB1</b>	20	40	62,19	80	100
<b>FB4</b>	20	40	41,04	60	80
<b>FB9</b>	60	80	100,67	120	140

Fonte: da autora.

Os efeitos da toxicidade foram definidos a partir da observação de evidências morfológicas de erosão tegumentar, descamação, bolhas, erupção, bandas de contração e alterações no tubérculo de superfície estrutura (colapso, fusão, presença e distribuição de espículas) (SILVA et al., 2014; DIAS et al., 2019).

#### **4.2.12 Avaliação *in vitro* do efeito do eugenol na atividade esquistossomicida em contato com o verapamil, um antagonista do canal de cálcio, em vermes adultos do *S. mansoni***

Posteriormente à perfusão, os vermes adultos foram lavados e transferidos para placas de cultura de 24 poços (um casal por poço), contendo meio de cultura RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) suplementado com 5,0 % (v/v) de soro fetal bovino (SBF) (Gibco Limited, Paisley, Scotland) inativado pelo calor e 1,0 % de penicilina (10000,0 UI/ml) estreptomicina / (10 mg/ml) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Foi adicionado em cada poço 1,0 µL de verapamil (solução estoque a 4,54 µg/ml), e posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5,0% CO<sub>2</sub> por 30 minutos. Após este período, foram adicionados nos poços 6,5 µL de metanol, PZQ (2 µg/ml) e diferentes concentrações de uma solução estoque dos derivados eugenólicos, sendo que um dos poços contiveram apenas o meio de cultura RPMI-1640 suplementado, além do verapamil isoladamente. Estas placas foram novamente incubadas por 2 horas, nas mesmas condições anteriores. Ao final deste período os parasitos foram levados para visualização no microscópio invertido para análise de motilidade e demais danos.

O verapamil foi adicionado ao PZQ e aos derivados eugenólicos FB1 (62,19µg/ml), FB4 (41,04µg/ml) e FB9 (100,67 µg/ml) utilizando seus respectivos ED<sub>50</sub>. Após 2 horas (em contato com o antagonista) e 24, 48, 72 horas e 7 dias (após a lavagem das placas e retirada das substâncias), foram realizados a avaliação do comportamento dos vermes adultos. Para, tanto, observou-se os seguintes parâmetros:

Quadro 1 – Parâmetros indicadores de atividade biológica e estudos de toxicidade com espécies de *Schistosoma*

- Acasalamento
- Movimentação
- Contração/encurtamento
- Morfologia
- Desprendimento do tegumento
- Presença de ovos

Fonte: da autora

#### **4.2.13 Avaliação *in vitro* do efeito do eugenol na atividade esquistossomicida em contato com a ouabaína, um antagonista da Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase, em vermes adultos do *S. mansoni***

Novamente seguiu-se o protocolo referente à perfusão retrógrada do fígado (conforme descrito anteriormente). Após a perfusão, os parasitas foram incubados e a ouabaína foi usada para bloquear a Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> - ATPase. Ela foi utilizada na concentração de 3,6 µg/ml. Posteriormente as placas foram incubadas em estufa a 37°C e 5,0% CO<sub>2</sub> por 30 minutos. Após este período, foram adicionados nos poços 40,0 µL de metanol, o PZQ (2 µg/ml) e diferentes concentrações de uma solução estoque dos derivados eugenólicos - FB1: 92,38 µg/ml, FB4 66,16 µg/ml e FB9: 162,62 µg/ml (desta vez utilizando seus respectivos ED<sub>100</sub>), sendo que um dos poços conteve apenas o meio de cultura RPMI-1640 suplementado. Estas placas foram novamente incubadas por 2 horas, nas mesmas condições anteriores. Ao final deste período os parasitos foram levados para visualização no microscópio invertido para análise de motilidade e demais danos. Após 2 horas (em contato com o antagonista) e 24, 48, 72 horas e 7 dias (após a lavagem das placas e retirada das substâncias), foram realizados a avaliação do comportamento dos vermes adultos.

### 4.3 ANÁLISE *IN SILICO*

As subunidades alfas e beta da Sódio-potássio ATPase de *Schistosoma mansoni* tiveram suas estruturas determinadas via estudos de modelagem molecular por homologia. Para obtenção dos modelos, foi utilizado o servidor online SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) e os modelos com melhores parâmetros inicialmente obtidos por homologia foram refinados utilizando o servidor online GalaxyRefinement (<http://galaxy.seoklab.org/cgi-bin/submit.cgi?type=REFINE>).

Para a subunidade alfa, a sequência alvo de 1007 AA utilizada foi obtida a partir do banco de dados UniProt, código Q95WT4. A estrutura da subunidade alfa de sódio-potássio ATPase renal de javali (PDB 3WGU) foi utilizada como molde para a homologia, com a qual a subunidade em estudo apresentava 74,90% de identidade sequencial. A estrutura obtida foi refinada e essa estrutura modelada será denominada modelo 1.

Para a subunidade beta, a sequência alvo de 293 AA utilizada foi obtida a partir do banco de dados UniProt, código C4PY08. A estrutura da subunidade beta de sódio-potássio ATPase bovina (PDB 4XE5) foi utilizada como molde para a homologia, com a qual a subunidade em estudo apresentava 35,29% de identidade sequencial.

Utilizando-se a ferramenta AutoLigand do programa AutoDockTools, realizou-se uma busca na estrutura por bolsos de interação dos derivados eugenólicos com os sítios em questão.

Os três derivados eugenólicos (FB1, FB4 e FB9) foram desenhados e otimizados utilizando o programa BIOVIA Discovery Studio v16.1.0.15350. Para a otimização, foi utilizado um campo de força tipo Dreiding. O arquivo contendo as coordenadas referentes à subunidade alfa da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase modelada foi utilizada para os estudos de interação ligante-alvo. O programa AutoDockTools 1.5.7 foi utilizado para a preparação da macromolécula (adição de cargas Gasteiger e tipo atômico AD4) e dos ligantes (definição de aspectos torcionais), permitindo a obtenção dos respectivos arquivos PDBQT referentes às estruturas citadas. Os estudos de docking foram realizados utilizando o programa AutoDock Vina 1.1.1. Para análises,

foi utilizada a conformação do ligante que gerou o complexo de menor energia com a enzima.

Um segundo modelo foi construído baseado na estrutura da subunidade alfa de sódio-potássio ATPase de tubarão ligada a ouabaína (PDB 3A3Y), a qual foi utilizada como molde para a homologia, cuja a subunidade em estudo apresentava 74,32% de identidade sequencial. A estrutura obtida foi refinada e essa estrutura modelada será denominada modelo 2.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE *IN VITRO*

#### 5.1.1 *Screening*

Após realização da análise dos 15 derivados eugenólicos e com base nos parâmetros de avaliação já citados anteriormente, constatou-se que, destes, apenas 3 apresentavam atividade esquistossomicida. Assim sendo, os testes seguintes foram realizados utilizando os seguintes derivados: FB1, FB4 e FB9. Assim, fracionou-se as concentrações de modo que as mesmas variaram de 20 a 140 µg/ml. As concentrações dos compostos foram determinadas a partir dos resultados apresentados quando em contato com os vermes adultos, sendo que os compostos apresentaram diferentes atividades em diferentes concentrações.

#### 5.1.2 Determinação do ED<sub>50</sub> dos derivados eugenólicos e praziquantel

Finalmente, após o *screening*, foram feitos testes com o objetivo de investigar mais detalhadamente a quantidade das substâncias que produziram a metade da resposta relativa à eficácia dessas substâncias (ED<sub>50</sub>), além da elucidação do mecanismo de ação através de diferentes técnicas. Como resultado, o controle RPMI-1640 manteve a motilidade dos vermes, uma vez que apenas simula as condições vividas no organismo do hospedeiro, com os nutrientes necessárias para sua sobrevivência no meio externo. Já os derivados eugenólicos FB1, FB4 e FB9, apresentaram ED<sub>50</sub> em 62,19 µg/ml, 41,04 µg/ml e 100,67 µg/ml, respectivamente (TABELA 3).

Num estudo realizado por Meister et al. (2014), as atividades *in vitro* do PZQ e seus principais metabólitos contra vermes adultos do *S. mansoni* foram investigadas. O PZQ, que é uma mistura racêmica de enantiômeros R e S, apresentou atividade com um ED<sub>50</sub> de 0,05 µg/ml após 72 h de incubação e ED<sub>90</sub> de 0,4 µg/ml no mesmo período (TABELA 3). Estes dados, por sua vez, servem como parâmetros comparativos da dose efetiva da resposta relativa à eficácia dos derivados

eugenólicos. Embora os valores de ED<sub>50</sub> dos derivados eugenólicos tenham sido altos em relação ao do PZQ, estas moléculas podem ser trabalhadas como protótipos para o desenvolvimento de outros derivados, principalmente pelo fato de que estes derivados apresentaram baixo valor de citotoxicidade (dados não mostrados).

Tabela 3 - Dose efetiva da resposta relativa à eficácia das substâncias testadas (ED<sub>50</sub>, ED<sub>90</sub> e ED<sub>100</sub>) em µg/ml

	ED <sub>50</sub>	ED <sub>90</sub>	ED <sub>100</sub>
PZQ	0,05	0,4	-
RPMI	-	-	-
METANOL	-	-	-
OUABAÍNA	-	-	-
VERAPAMIL	-	-	-
FB1	62,19	86,34	92,38
FB4	41,04	61,14	66,16
FB9	100,67	152,03	162,62

Fonte: da autora

### 5.1.3 Efeito dos derivados eugenólicos sobre a atividade motora dos vermes adultos de *S. mansoni*

A análise qualitativa da atividade de *S. mansoni* se caracteriza como um dos métodos mais usuais de avaliação da atuação de fármacos sobre o parasito. Neste sentido, o sistema neuromotor de *S. mansoni* constitui-se como um interessante alvo para se estudar novos compostos esquistossomicidas. Posto isto, vale ressaltar que, preliminarmente, foram realizados estudos por Bennett e Bueding (1971) para avaliação da atividade motora de *S. mansoni* em escala visual, demonstrando, portanto, o pioneirismo neste tipo de análise.

Um estudo sobre o sistema neuromotor do *S. mansoni* demonstrou que a paralisia dos vermes estava associada, em suma, a importantes neurotransmissores ou neuromoduladores, tais como a dopamina, acetilcolina e/ou serotonina (NOEL, 2008). Posto isto, neste trabalho utilizou-se o mesmo parâmetro avaliativo – o qualitativo, neste caso, mais especificamente sobre a atividade motora do verme. Para tanto, seguiu-se o método utilizado por Oliveira et al. (2017), onde foi estabelecida uma



escala de movimentação de 0 – 3 para avaliação da motilidade dos parasitas em contato com diferentes concentrações de derivados eugenólicos.

De acordo com nossos dados, foi observada a redução de atividade motora diretamente proporcional à concentração e o período de incubação das amostras avaliadas (TABELA 4 – 6). O derivado eugenólico FB1 demonstrou maior atividade sobre a motilidade dos vermes adultos a partir da concentração de 60 µg/mL, onde a escala de movimentação nas primeiras 24 horas foi baixa (1) e, após 192 horas de incubação foi ausente (0) (TABELA 4). Já o derivado eugenólico FB4 causou redução da atividade motora já na concentração de 30 µg/mL, onde apresentou baixa atividade motora (1) com 72 horas de contato com as amostras, e atividade motora nula com 192 horas. Este resultado se repetiu até 40 µg/mL. Nas concentrações seguintes, em todas as horas de incubação, observou-se ausência de atividade motora (TABELA 5). Até a concentração de 80 µg/mL, o derivado eugenólico FB9 não causou alteração na atividade motora dos vermes adultos (quando comparados ao controle). Ainda em relação ao FB9, somente a partir da concentração de 100 µg/mL é que pôde-se observar uma redução da atividade motora, apresentando-se ela como moderada (2) em 24 horas de incubação, baixa (1) em 72 horas de incubação e ausente (0) com 192 horas de incubação, nas concentrações de 100 a 140 µg/mL (TABELA 6). Como descrito acima, os derivados eugenólicos (FB1, FB4 e FB9) apresentaram um efeito dose-resposta. Este resultado, por sua vez, se corrobora quando se compara aos parasitas do grupo controle, mantidos apenas em RPMI- 1640 e metanol. Nestas condições verificou-se motilidade intensa (3) dos vermes adultos até o final das observações, portanto, 192 horas.

Tabela 4 - Motilidade dos vermes adultos de *S. mansoni* após exposição à diferentes concentrações do derivado eugenólicos FB1, até 192 horas de incubação

Amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tempo de exposição (horas)	Atividade motora			
		Intensa 3	Moderada 2	Baixa 1	Ausência 0
FB1	30 $\mu\text{g/mL}$	24	X		
		72		X	
		192			X
	40 $\mu\text{g/mL}$	24		X	
		72			X
		192			X
	50 $\mu\text{g/mL}$	24		X	
		72			X
		192			X
60 $\mu\text{g/mL}$	24			X	
	72			X	
	192				X
70 $\mu\text{g/mL}$	24			X	
	72			X	
	192				X
80 $\mu\text{g/mL}$	24			X	
	72				X
	192				X
PZQ	0 - 6				X
RPMI	24	X			
	72	X			
	192	X			
METANOL	24	X			
	72	X			
	192	X			

Fonte: da autora

Tabela 5 - Motilidade dos vermes adultos de *S. mansoni* após exposição à diferentes concentrações do derivado eugenólicos FB4, até 192 horas de incubação

Amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tempo de exposição (horas)	Atividade motora			
		Intensa 3	Moderada 2	Baixa 1	Ausência 0
30 $\mu\text{g/mL}$	24		X		
	72			X	
	192				X
40 $\mu\text{g/mL}$	24			X	
	72				X
	192				X
50 $\mu\text{g/mL}$	24				X
	72				X
	192				X
60 $\mu\text{g/mL}$	24				X
	72				X
	192				X
70 $\mu\text{g/mL}$	24				X
	72				X
	192				X
80 $\mu\text{g/mL}$	24				X
	72				X
	192				X
PZQ	0 - 6				X
RPMI	24	X			
	72	X			
	192	X			
METANOL	24	X			
	72	X			
	192	X			

Fonte: da autora

Tabela 6 - Motilidade dos vermes adultos de *S. mansoni* após exposição à diferentes concentrações do derivado eugenólicos FB9, até 192 horas de incubação

Amostra ( $\mu\text{g/mL}$ )	Tempo de exposição (horas)	Atividade motora			
		Intensa 3	Moderada 2	Baixa 1	Ausência 0
40 $\mu\text{g/mL}$	24	X			
	72	X			
	192	X			
60 $\mu\text{g/mL}$	24	X			
	72	X			
	192	X			
80 $\mu\text{g/mL}$	24	X			
	72	X			
	192	X			
100 $\mu\text{g/mL}$	24		X		
	72			X	
	192				X
120 $\mu\text{g/mL}$	24		X		
	72			X	
	192				X
140 $\mu\text{g/mL}$	24		X		
	72			X	
	192				X
PZQ	0 - 6				X
RPMI	24	X			
	72	X			
	192	X			
METANOL	24	X			
	72	X			
	192	X			

Fonte: da autora

#### 5.1.4 Efeito dos derivados eugenólicos sobre o acasalamento e eliminação de ovos dos vermes adultos de *S. mansoni*

O *S. mansoni* se diferencia dos demais trematódeos hermafroditas por apresentar um dimorfismo sexual acentuado, onde existe uma co-dependência entre machos e fêmeas. Este fato ocorre, pois, na ausência do verme macho, inexistente a possibilidade de perpetuação do desenvolvimento e maturação sexual da fêmea (GALANTI et al., 2012). Além disso, é através do canal ginecóforo presente no macho que ocorre parte do desenvolvimento da fêmea. É também nesta estrutura que ocorre o acasalamento e posterior maturação sexual juntamente da produção de ovos (LOVERDE, 2002).

Posto isto, fica evidente o interesse em avaliar o efeito das substâncias frente o acasalamento e a eliminação de ovos das fêmeas de *S. mansoni*. Assim, neste estudo, foi feita a investigação sobre a influência dos derivados eugenólicos – FB1, FB4 e FB9 – sobre o acasalamento e eliminação dos ovos (TABELA 7).

Tabela 7 - Efeito dos tratamentos sobre a separação de casais de *S. mansoni* e eliminação de ovos até 192 horas de incubação

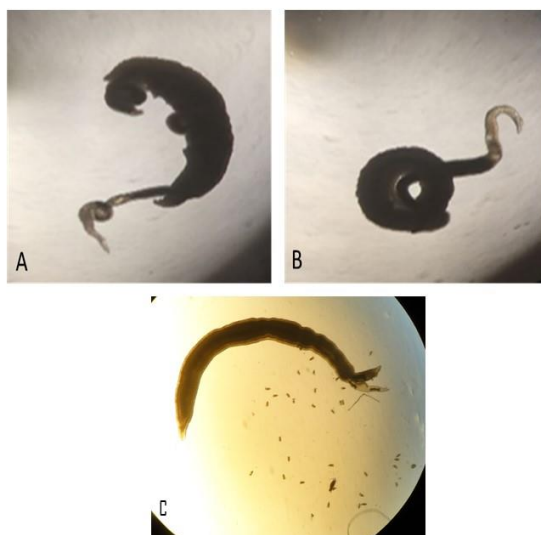
Amostras Avaliadas	0 – 24 horas		72 horas		192 horas	
	Separação dos casais	Oviposição (%)	Separação dos casais	Oviposição	Separação dos casais	Oviposição
FB1	75%	0%	75%	0%	75%	0%
FB4	75%	0%	75%	0%	75%	0%
FB9	50%	0%	50%	0%	50%	0%
PZQ	0%	0%	0%	0%	0%	0%
RPMI	0%	40%	0%	60%	0%	100%
METANOL	0%	40%	0%	60%	0%	100%

Fonte: da autora

O efeito praticamente instantâneo do PZQ provoca paralisia estática dos vermes, e, assim faz com que os mesmos morram acasalados, portanto, sem separação dos casais (FIGURA 5). Apesar disso, não foi observada postura de ovos nestas condições. Curiosamente, os derivados eugenólicos demonstraram efeito parecido ao PZQ a respeito do acasalamento e oviposição. Isto porque, apesar de ter sido observado o majoritário acasalamento dos casais, não houve oviposição, indicando que, provavelmente o efeito sobre a motilidade dos vermes impossibilitou a continuação da oviposição. O mesmo efeito sobre a oviposição foi observado em situações em que os vermes se apresentaram desemparelhados.

O comportamento dos vermes em contato com o metanol foi similar ao RPMI-1640 e, portanto, os vermes movimentavam-se normalmente. Levando em conta os parâmetros avaliados, os vermes nas condições de controle, apresentavam motilidade intensa, sistema excretor ativo, acasalados e realizando oviposição, além disso, o tegumento apresentava-se íntegro (visível na objetiva de 40x do microscópio invertido).

Figura 5 - Cultura *in vitro* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos ao PZQ e RPMI-1640



Fonte: da autora

Legenda: A e B: vermes adultos expostos ao PZQ acasalados e contraídos 2 horas após a incubação; C: casal de vermes incubados apenas com o meio de cultura RPMI-1640.

Observou-se que 75% dos casais de vermes expostos aos derivados eugenólicos FB1 e FB4 foram separados desde a primeira hora de contato até o último dia de leitura, com 192 horas de incubação (FIGURA 6). Apesar disso, em diferentes períodos de avaliação, não foi observado oviposição. O FB9, por sua vez, causou a separação de 50% dos casais, porém, também não foi observado oviposição.

É sabido que os ovos do *S. mansoni* desempenham papel crucial na patologia da doença. Normalmente, os vermes adultos que circulam a corrente sanguínea não causam problemas severos. Em contrapartida, os ovos produzidos pela fêmea são responsáveis pelo aspecto patológico mais significativo da esquistossomose: a reação granulomatosa. Esta que, por sua vez, se dá em torno dos ovos no fígado e intestino delgado. Ademais, os ovos são cruciais para a transmissão dessa infecção (FREITAS et al., 2007; BURKE et al., 2009).

O cravo-da-índia possui componentes ativos que dão origem ao eugenol e ao isoeugenol. Este composto tem sido objeto de estudos recente, principalmente pelo seu potencial na prevenção de doenças crônicas, tais como nas reações inflamatórias, o câncer, e demais situações. Foi demonstrado através de experimentação *in vitro* e *in vivo* que o eugenol possui múltiplas atividades antioxidantes (dimerização, reciclagem e efeito quelante) em uma molécula, tendo assim o potencial de aliviar e prevenir doenças crônicas (FUJISAWA E MURAKAMI, 2016). Além disso, é sabido que o eugenol possui relevantes efeitos antimicrobianos contra microrganismos causadores de doenças infecciosas (MEHER e CHAKRABORTY, 2018). O eugenol é, portanto, uma substância natural que possui um amplo espectro de atividades biológicas (NAGABABU et al., 2010). Neste trabalho foi possível demonstrar que o eugenol possui também interessante atividade contra vermes adultos de *S. mansoni*, sobretudo na ruptura da oviposição da fêmea.

Figura 6 - Cultura *in vitro* de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* expostos aos derivados eugenólicos



Fonte: da autora

Legenda: A, B e C: fotografia de cultura de vermes com 192 horas de incubação demonstrando separação dos casais. Vermes expostos, respectivamente ao FB1, FB4 e FB9.

### 5.1.5 Efeito dos derivados eugenólicos sobre a mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni*

Apesar da esquistossomose atingir milhares de pessoas no mundo, o PZQ é o único fármaco disponível atualmente para o tratamento desta doença (WHO, 2002). Ademais, o PZQ apresenta algumas desvantagens, tal como a ineficácia contra formas juvenis do parasita (PICA-MATTOCCIA, L. E CIOLI, D. 2004). Portanto, a cura através deste tratamento não é completa. Em áreas de larga endemicidade há o risco eminente de cepas resistentes ao PZQ, principalmente pela constante reinfeção (DE OLIVEIRA et al., 2012; KAMEL et al., 2011). Diante disto, surge a necessidade urgente

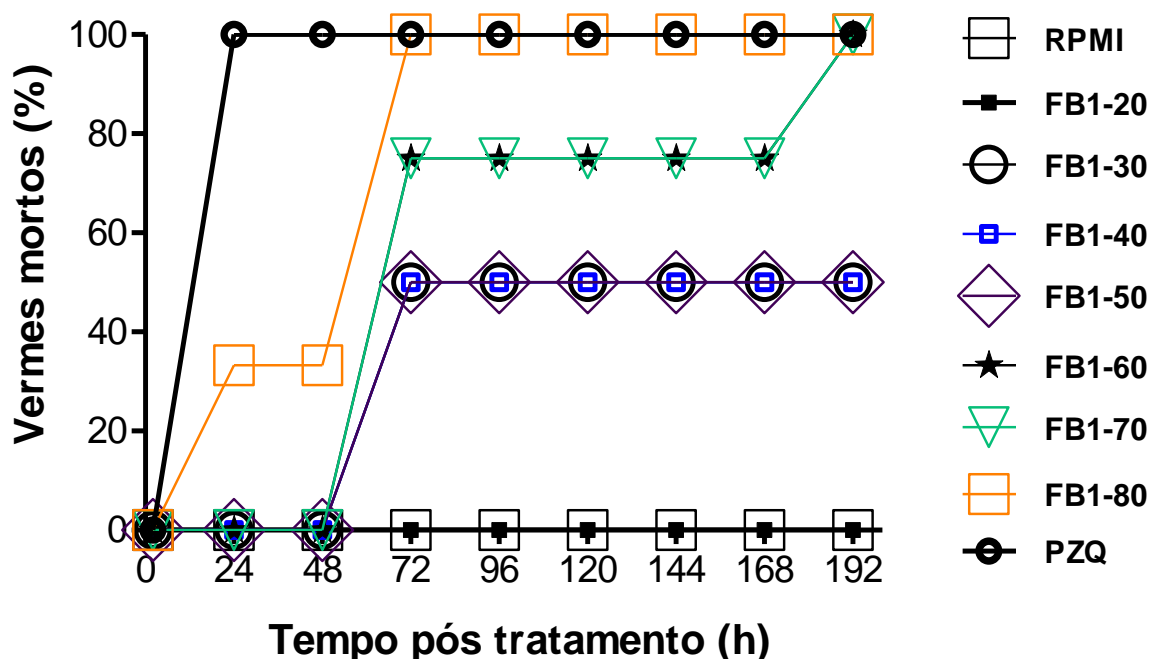


de novas intervenções, incluindo novos compostos com mecanismo de ação semelhantes ao PZQ (BRINDLEY e HOTEZ, 2013).

Segundo Oliveira et al. (2012), a observação das alterações fisiológicas e morfológicas, além do efeito letal sobre um organismo estudado, se dá pela triagem *in vitro* das substâncias químicas. Neste sentido, a partir dos nossos estudos, foi possível observar que as amostras analisadas (FB1, FB4 e FB9) provocaram a mortalidade dos vermes de maneira dose-dependente. Em outras palavras, a letalidade dos parasitas foi diretamente dependente da concentração avaliada e do período de exposição (GRÁFICO 1 - 3).

Em consonância com nossos dados, todas as amostras provocaram mortalidade dos vermes, porém em diferentes tempos e concentrações. Observamos que na concentração de 80 µg/mL do FB1, o mesmo ocasionou 100% da mortalidade dos vermes machos e fêmeas já com 72 horas de incubação (GRÁFICO 1) e nas concentrações de 60, 70 e 80 µg/mL causou a morte de todos os vermes no último dia de análise (192 horas).

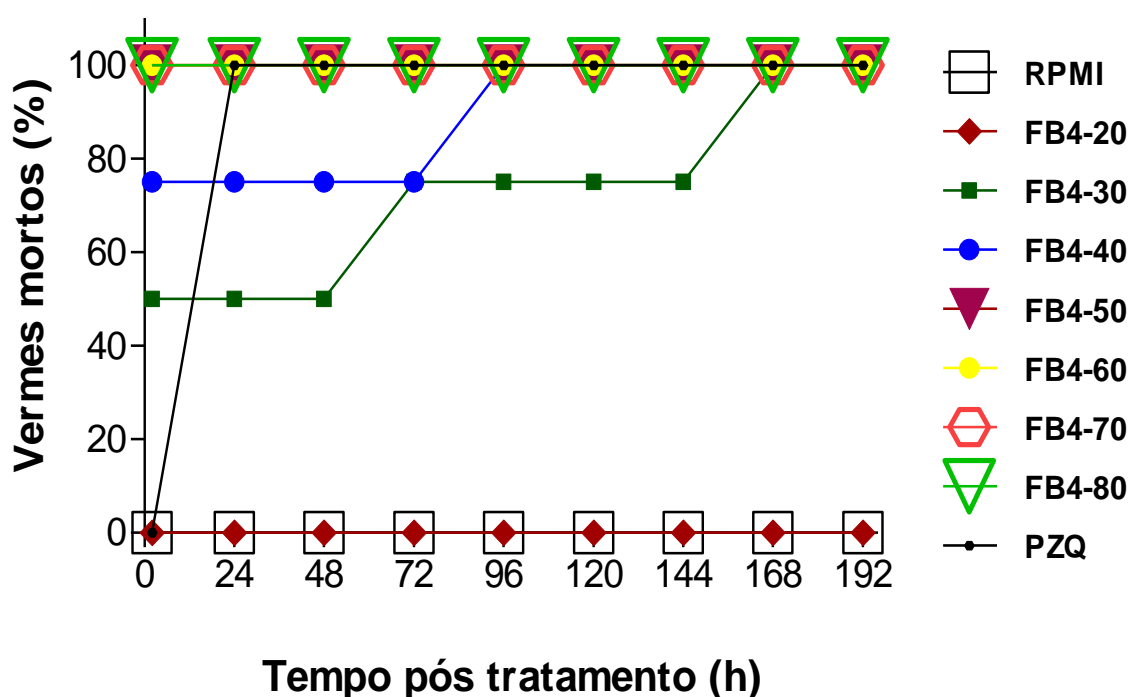
Gráfico 1 – Efeito do FB1 sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em relação à concentração avaliada e período de incubação de 192 horas. Controle farmacológico exposto a 2 µg/mL de PZQ.



Fonte: da autora

Adicionalmente, o derivado FB4 causou mortalidade de todos os vermes no último dia de análise (192 horas), porém, os melhores resultados foram observados quando os parasitas foram expostos a concentração de 50, 60, 70 e 80  $\mu\text{g}/\text{mL}$  do FB4, os quais ocasionaram 100% da mortalidade dos vermes machos e fêmeas nas primeiras 24 horas de incubação (GRÁFICO 2).

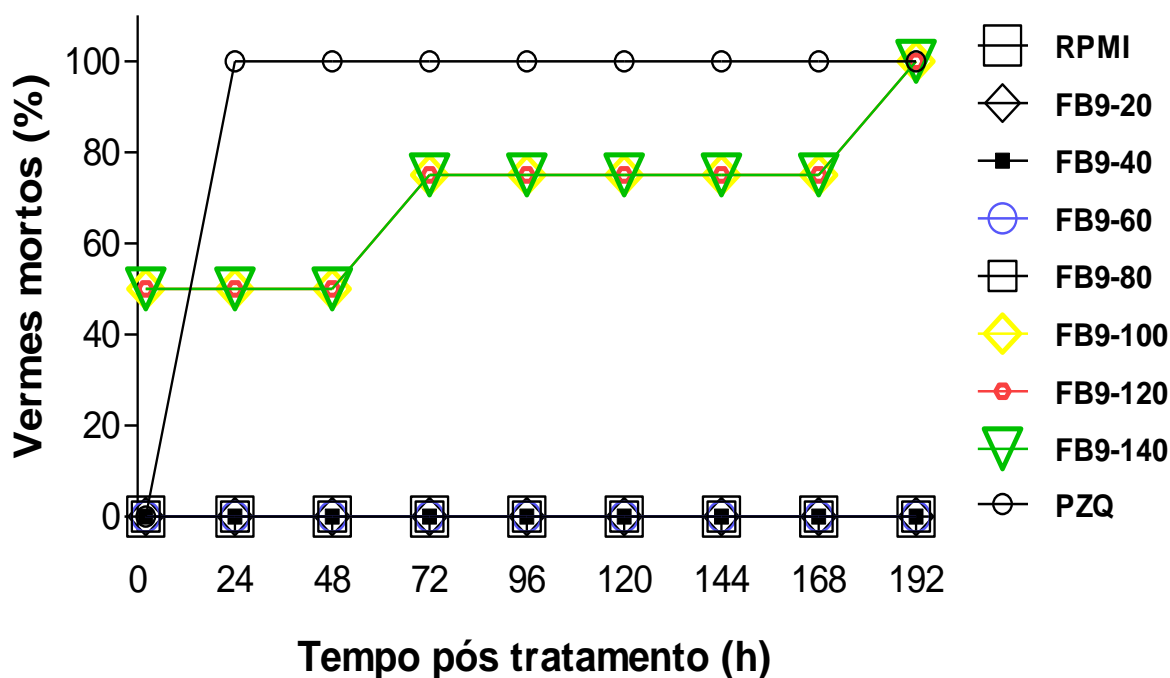
Gráfico 2 - Efeito do FB4 sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em relação à concentração avaliada e período de incubação de 192 horas. Controle farmacológico exposto a 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de PZQ.



Fonte: da autora

Em relação ao FB9, somente no último dia de incubação (192 horas de contato), nas concentrações de 100, 120 e 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$  é que foi observada a mortalidade de 100% dos vermes (GRÁFICO 3).

Gráfico 3 - Efeito do FB9 sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em relação à concentração avaliada e período de incubação de 192 horas. Controle farmacológico exposto a 2 µg/mL de PZQ.



Fonte: da autora

Observa-se, portanto, que os derivados eugenólicos causaram o mesmo efeito de mortalidade nos vermes, porém, em diferentes tempos e concentrações. Este fato indica que, muito provavelmente existam diferentes mecanismos para a ação dos mesmos sobre os parasitas.

A atividade antiparasitária do PZQ foi observada no início dos anos 1970 nos laboratórios da Bayer, Alemanha (ANDREWS, 1981). A dependência do PZQ para o tratamento e controle da esquistossomose, portanto, se dá há mais de 40 anos. Apesar de muitos anos de uso e tratamento de milhões de pessoas, o (s) mecanismo (s) de ação do PZQ ainda não foi totalmente estabelecido. Não obstante, Cioli et al. (2014), descrevem os efeitos primários exercidos pelo PZQ nas seguintes categorias: (i) influxo de cálcio em todo o parasito, (ii) contração muscular e (iii) modificações superficiais.

### 5.1.6 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* do verapamil, um antagonista do canal de cálcio em vermes adultos do *S. mansoni*

A fim de observar o mecanismo de ação dos derivados eugenólicos perante os vermes adultos de *S. mansoni*, o FB1, FB4 e FB9 foram postos em combinação com o verapamil, um antagonista de cálcio. Utilizou-se para cada derivado eugenólico, os seus respectivos ED<sub>100</sub>, portanto, uma faixa padronizada e conhecida capaz de causar a mortalidade de 100% dos vermes.

Os parasitos incubados com o verapamil, o PZQ e os derivados eugenólicos foram observados por microscópio invertido. Como esperado, o verapamil em combinação com o PZQ, inibiu sua atividade, uma vez que foi observado uma movimentação nas ventosas dos vermes e uma motilidade reduzida, com 72 horas de contato. Como já relatado aqui, o PZQ isoladamente, provoca a morte – praticamente - instantânea nos vermes adultos, causando paralisia estática e ruptura tegumentar.

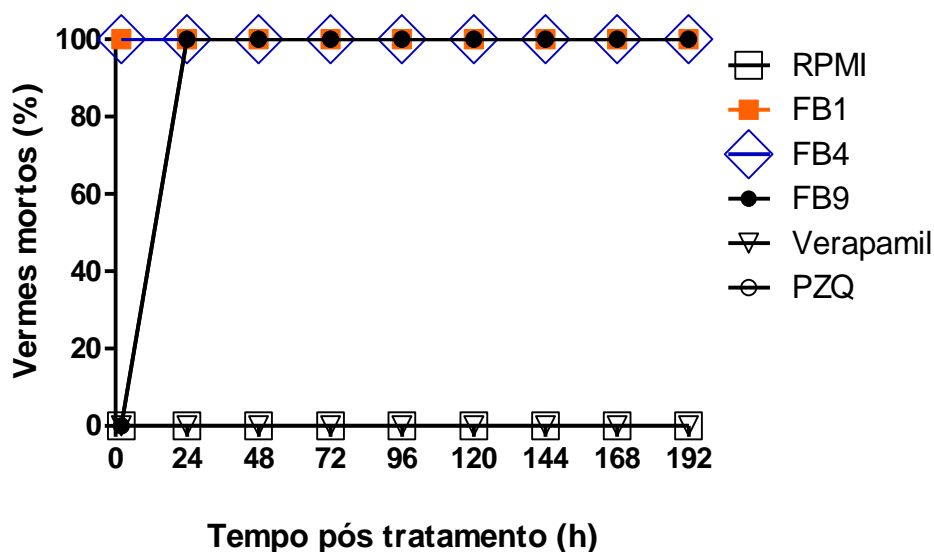
De acordo com nossos experimentos, os vermes adultos em contato com o PZQ, após 2 horas de leitura, já apresentavam a morfologia prevista, caracterizada por uma paralisia estática e ruptura tegumentar (PICA-MATTOCCIA, L. et al., 2007). No entanto, vimos que na presença de verapamil, a atividade do PZQ foi diminuída. Assim, nossos estudos corroboraram com os experimentos de Da Silva & Noël (1995), uma vez que o PZQ exerce atividade sobre o verme adulto *in vitro* através dos canais de cálcio, sendo que sua atividade é anulada na ausência de cálcio externo ou na presença de verapamil. Este mecanismo é atribuído à modulação da subunidade  $\beta$  do canal de cálcio do tipo L, o que por sua vez, leva a abertura do mesmo (KOHN et al., 2003).

O FB1 e FB4 parece não ter tido interação com os canais de cálcio quando em contato com o verapamil. Isto porque ambos isoladamente ou em combinação com o antagonista de cálcio, causaram a morte de 100% dos vermes nas primeiras horas de contato. Portanto, não houve alteração do efeito dos derivados eugenólicos (FB1 e FB4) em contato com o antagonista de cálcio.

O FB9, no entanto, demonstrou ter alguma dependência em relação ao cálcio. Isto porque, isoladamente e com 2 horas de contato, o FB9 causou a morte de 50%

dos vermes. Em contrapartida, em combinação com o verapamil, houve o retardamento da mortalidade dos vermes, uma vez que estes apresentaram motilidade ativa com 2 horas de leitura, além de outros parâmetros avaliativos, que se demonstraram normais. Após o período de 24 horas, no entanto, o FB9 juntamente com o verapamil causaram a morte dos vermes. Assim, durante os sete dias de experimento, pôde-se observar 100% de mortalidade dos vermes nas primeiras horas de incubação com os derivados eugenólicos FB1 e FB4 enquanto que o FB9 não causou o mesmo efeito, ocorrendo este somente a partir de 24 horas de incubação. Após este período, no entanto, os três compostos apresentaram o mesmo efeito de 100% de mortalidade (GRÁFICO 4).

Gráfico 4 - Efeito dos derivados eugenólicos sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em contato com o verapamil.



Fonte: da autora

Sabe-se que a perpetuação (transmissão) e patologia da esquistossomose se dá pela produção de ovos pelos vermes adultos fêmeas de *S. mansoni*. Bioquimicamente, essa produção compreende a biossíntese e armazenamento de proteínas de casca de ovo em células vitelinas, exocitose de proteínas de casca de ovo a partir de células vitelinas e reticulação de proteínas de casca de ovo pela atividade da fenol oxidase. Muito embora a documentação destes eventos não esteja

totalmente compreendida, existem evidências que sugerem que o cálcio esteja envolvido na regulação da reprodução do esquistossomo (BASCH, 1991). Neste sentido, o derivado eugenólico FB9 pode estar agindo no mesmo alvo que o do canal de cálcio age, uma vez que este composto na presença do verapamil não reduziu a motilidade e/ou causou a mortalidade dos vermes nas primeiras horas de contato (o que normalmente ocorre somente na presença do FB9).

#### **5.1.7 Avaliação da atividade esquistossomicida *in vitro* da ouabaína, um antagonista da Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> - ATPASE em vermes adultos do *S. mansoni***

Novamente, a fim de observar o mecanismo de ação dos derivados eugenólicos perante os vermes adultos de *S. mansoni*, os vermes adultos incubados com a ouabaína em combinação com o PZQ e os derivados eugenólicos, foram observados por microscópio invertido. Como mencionado anteriormente, somente os derivados eugenólicos são capazes de causar mortalidade de 100% dos vermes numa faixa padronizada e conhecida (ED<sub>100</sub>).

No entanto, com 2 horas de contato com o antagonista de Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase e os derivados eugenólicos, pôde-se observar motilidade moderada dos vermes, mostrando, portanto, alguma relação dos derivados eugenólicos com a Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> ATPase. Nos controles com PZQ e RPMI, não foi verificada diferenças na presença/ausência da ouabaína.

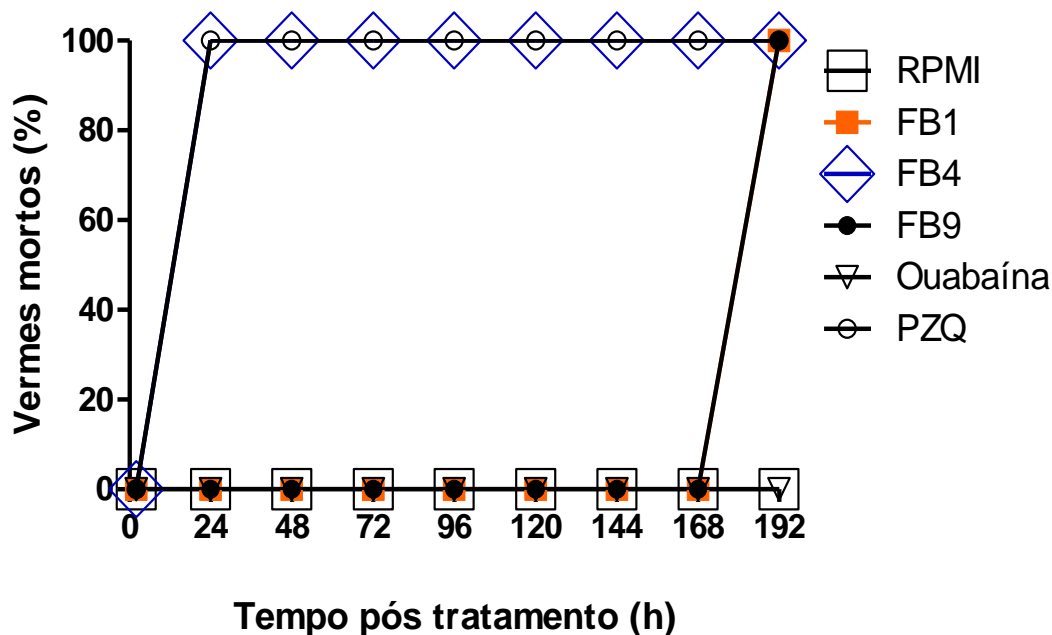
A partir de 72 horas de incubação, o FB1 foi capaz de causar a mortalidade de 100% dos vermes. Quando em contato com a ouabaína, no entanto, não foi observada a mortalidade de nenhum verme. Condição que somente se alterou com 192 horas de incubação, onde finalmente se observou a mortalidade de 100% dos vermes em contato com a ouabaína.

Por sua vez, o FB4 nas primeiras 2 horas de contato, foi capaz de causar a mortalidade de 100% dos parasitas, o que, em contato com a ouabaína só ocorreu após 24 horas.

Finalmente o derivado eugenólico FB9, nas primeiras 2 horas de contato, ocasionou 50% da mortalidade dos vermes, enquanto que nas condições onde a

ouabaína estava em contato com os parasitas, o FB9 nas primeiras 2 horas de contato não havia causado mortalidade, ocorrendo esta somente a partir de 192 horas (GRÁFICO 5).

Gráfico 5 - Efeito dos derivados eugenólicos sobre a taxa de mortalidade dos vermes adultos de *S. mansoni* em contato com a ouabaína



Fonte: da autora

Em todos os testes com os derivados eugenólicos foi observado, considerando o tempo de avaliação e a concentração testada, um efeito danoso aos parasitos, uma vez que todos apresentavam desprendimento de tegumento com bolhas (evidenciando lesão de tegumento) e sistema digestivo parado, sem mencionar a redução de motilidade, ausência de acasalamento e consequente oviposição e mortalidade. Muito provavelmente este composto pode estar alterando a homeostasia da  $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$ , o que pode estar contribuindo na desregulação da manutenção do potencial de repouso das células nervosas e musculares do verme. Esta hipótese é respaldada pelo trabalho de Usta et al. (2003), onde os mesmos demonstraram que um dos principais componentes do eugenol (canela e cravo) inibiram a atividade de  $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$  de fígado de rato. Sendo assim a  $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$  se constitui como

um possível alvo para ação de derivados eugenólicos, o que biologicamente pode resultar num desequilíbrio eletrolítico e desarranjos na função mitocondrial.

Em relação ao acasalamento e oviposição, foi constatado os mesmos resultados nas duas condições (com ou sem o antagonista), ou seja, ausência de ovos e vermes acasalados e desemparelhados (o que por sua vez, não alteraram a postura de ovos). Este resultado se reproduziu nos experimentos com o antagonista de cálcio (verapamil).

Marchese et al. (2017), realizou uma revisão investigativa do mecanismo de ação do eugenol em relação a diferentes microrganismos patogênicos. No tocante às bactérias, por exemplo, existem diferentes mecanismos pelos quais se explicaria a atividade biológica do eugenol. Dentre eles, a ruptura da membrana citoplasmática que, por sua vez, aumenta a permeabilidade inespecífica da membrana e afeta o transporte de íons e ATP (DEVI et al., 2013). Um outro mecanismo de ação descrito em relação a bactérias se dá pela modificação do perfil de ácidos graxos da membrana das bactérias (DI PASQUA et al., 2007). Em um outro estudo, Hyldgaard et al. (2012), demonstraram a relevante capacidade do eugenol em causar citotoxicidade celular devido a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS). É sabido que esta ocorrência acarreta na inibição do crescimento de células, rompimento da membrana celular e danos no DNA, resultando, finalmente, em decomposição celular e morte. Ainda segundo o estudo de Hyldgaard, o eugenol demonstrou ser ativo contra algumas enzimas bacterianas, tais como proteases, histidina carboxilase, amilase e ATPase.

Considerando os dados apresentados e em relação ao antagonista de  $\text{Na}^+ \text{K}^+$  - ATPase, o FB1 em contato com a ouabaína reduziu a motilidade dos vermes em 192h de contato - último dia de leitura (sendo que normalmente ele reduz por completo com 72h sem o antagonista, ou seja, houve alteração). O FB4 em contato com a ouabaína reduziu a motilidade dos vermes em 24h de contato (sendo que normalmente ele reduz a motilidade por completo com 24h sem antagonista, portanto não houve modificação). Já o FB9, em contato com a ouabaína, reduziu a motilidade dos vermes com 192h de contato (sendo que normalmente ele reduz por completo com 168h sem o antagonista, e então neste caso, houve alteração). Diante do exposto, vê-se uma relação tempo-dependente dos derivados eugenólicos, uma vez que houve retardamento da motilidade/morte dos parasitos em contato com o inibidor



da  $\text{Na}^+ \text{K}^+ - \text{ATPase}$ . Não obstante, vê-se que a  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$  não inibiu completamente a atividade do eugenol, demonstrando assim que talvez o FB4 (composto o qual não demonstrou relação tempo-dependente) esteja agindo em outros alvos do parasito, que não a  $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{ATPase}$ .

Podem existir num mesmo grupo, diferentes mecanismos de ação que expliquem a atividade de um composto biológico. Sobre o eugenol e relacionado aos fungos, isto não é diferente. Bennis et al. (2004) e posteriormente Braga et al. (2007) observaram alterações morfológicas no envelope de *S. cerevisiae* e *C. albicans*, (respectivamente) causadas pelo eugenol. A partir daí, propuseram que um dos mecanismos de ação do eugenol contra fungos estaria relacionado com sua característica química. Por se tratar de uma substância lipofílica, sua atividade poderia se dar pela penetração das cadeias acíclicas gordurosas da bicamada lipídica da membrana, gerando uma turbulência na fluidez e permeabilidade membranosa. Mais tarde, Ahmad et al. (2010), verificou a inibição da atividade da  $\text{H}^+ \text{ATPase}$  de *Candida* spp. causada pelo eugenol, além da inibição da excreção de  $\text{H}^+$  estimulada por glicose.

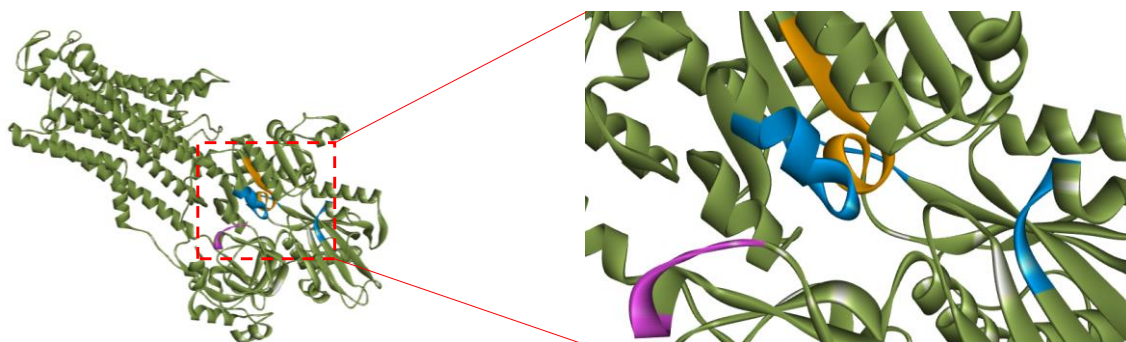
Shang et al. (2019), avaliaram o possível mecanismo de ação de derivados eugenólicos contra *Psoroptes cuniculi* investigado pela determinação das atividades inibitórias contra a acetilcolinesterase (AChE) e glutathione-S-transferase (GST) do citocromo P450 (P450). Ainda segundo o estudo de Shang, os autores demonstraram que o eugenol inibe significativamente a atividade enzimática contra ácaros. Portanto, está se constitui como uma ferramenta interessante para elucidar quais são os alvos bioquímicos que as substâncias agem.

## 5.2 ANÁLISE *IN SILICO*

O modelo referente a subunidade alfa da sódio-potássio ATPase, após refinamento, apresentou um gráfico de Ramachandran, o qual indicava 98,6% dos aminoácidos ocupando regiões favoráveis e 99,9% dos aminoácidos ocupando regiões permitidas. Já a subunidade beta indicava 97,3% dos aminoácidos ocupando regiões favoráveis e 98,5% dos aminoácidos ocupando regiões permitidas.

De acordo com Skelly et al. (2001), a subunidade alfa da SNaK1 apresenta diversos motivos conservados como o sítio catalítico de fosforilação (sítio P), que compreende a sequência de aminoácidos 357ICSDKTGTLT366 que contém ainda o aminoácido ASP360 fosforilado. Além desse, ainda apresenta outros motivos que foram sugeridos como contendo pelo menos parte do domínio de ligação do ATP (491KGAPE495, 577DPPR580 e 699TGDGVNDSPAL709) e um domínio de ligação para vanadato, um análogo de fosfato, que compreende a sequência 202LTGES206. Na Figura 7, esses sítios estão destacados na estrutura proteica refinada obtida da subunidade alfa.

Figura 7 - Sítios conservados na estrutura modelada da subunidade alfa de SNaK1: sítio catalítico de fosforilação (em laranja), domínio de ligação de ATP (em azul) e domínio de ligação para vanadato (em rosa)



Fonte: Laboratório de Fitoquímica, Unifal/MG.

Por se tratar de uma região conservada, é possível que ela seja um importante sítio para ligação de compostos que porventura possam exercer um efeito inibidor enzimático. Por isso, a região mostrada na Figura 7 foi considerada inicialmente na busca de interação dos compostos em estudo e subunidade enzimática alfa. Na busca por bolsos de interação, a região de interação do ATP foi destacada, confirmando a hipótese inicial. Assim, a área de busca conformacional foi definida como uma caixa com as dimensões 16 Å x 16 Å x 16 Å, centralizada no ponto de coordenada 73,364 x 38,882 x 6,657. Como a sensibilidade a vanadato e ouabaína são menores por parte das enzimas de *S. mansoni* em relação à enzima de mamífero, é possível que inibidores da SNaK1 interajam não com os sítios explorados pelos ligantes citados, mas com outros sítios essenciais ao pleno funcionamento da enzima como os sítios

de fosforilação e de ligação ao ATP. Porém, seria importante considerar algum efeito de interação dos derivados eugenólicos com o canal iônico.

Para avaliar uma possível interação com a região de canal da enzima, mais especificamente, se haveria possibilidade de interação das substâncias em estudo com a mesma região de interação da ouabaína foi utilizado o modelo 2. A estrutura obtida foi refinada, obtendo-se um modelo cujo gráfico de Ramachandran indicava 99% dos aminoácidos ocupando regiões favoráveis e 100% dos aminoácidos ocupando regiões permitidas. Nessa segunda análise, a região de interação da ouabaína foi explorada, determinando-se assim uma área de busca conformacional definida como uma caixa com as dimensões 16 Å x 16 Å x 16 Å, centralizada no ponto de coordenada 146,941 x 15,247 x -2,025.

Na Tabela 8, são apresentadas as energias previstas para os complexos mais estáveis formados pelos ligantes em estudo e a região de interação do ATP ou a região de interação da ouabaína na enzima Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase de *S. mansoni* modelada.

Tabela 8 - Resultados obtidos a partir dos estudos de docking entre os derivados de eugenol e os modelos 1 e 2 obtidos para a enzima Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase de *S. mansoni*

Compostos	Energia de ligação (kcal/mol) – sítio ATP (modelo 1)	Principais Interações com sítio ATP (tipo de interação)	Energia de ligação (kcal/mol) – canal (modelo 2)	Principais Interações com canal (tipo de interação)
<b>FB1</b>	-6,1	SER468, THR600, VAL702, ASN703 (VdW) C=O:THR362; C=O:GLY601; C=O:ASP602 (LH) Anel aromático:LYS471; Anel	-5,0	GLY91, LEU120, GLY310, ILE312, VAL313, PHE773 (VdW) C=O:THR787; H <sub>3</sub> CO:CYS95 (LH)

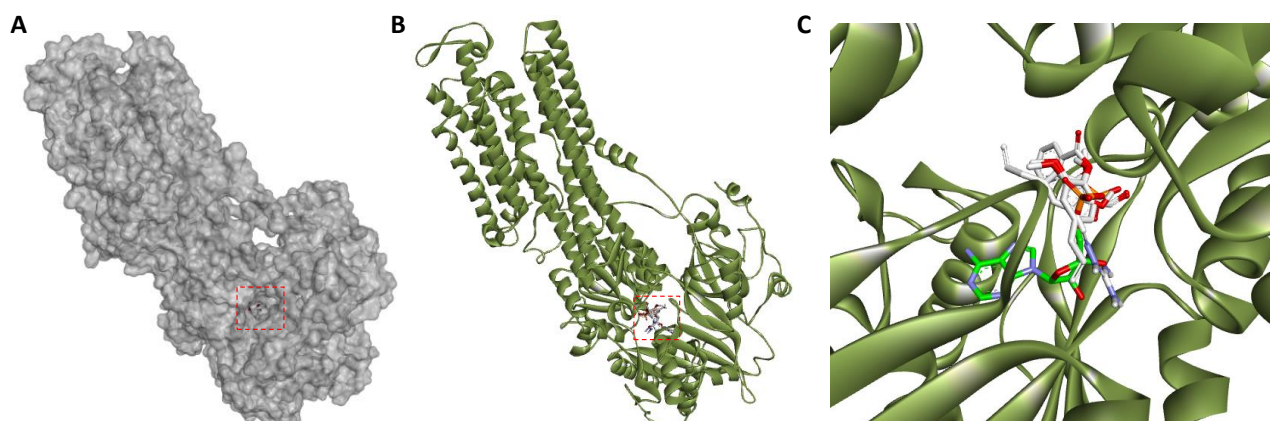
		aromático:ARG534 (Cation-pi) PHE466, SER468, ALA493, PRO494, HIS603, ARG675 (VdW)		LEU116, GLU303, ILE306, PHE307, ILE311, VAL313, THR787 (VdW)
<b>FB4</b>	-6,5	Ar-C=N:ARG534 (LH) Anel aromático:ARG534 (Cation-pi) ASP360, ASN368, ASP434, ALA435, SER468, THR600, ASP700, GLY701, VAL702, ASN703 (VdW)	-6,1	(H <sub>2</sub> N) <u>2</u> C= <u>N</u> - N=C:GLY310 (LH) (H <sub>2</sub> N) <u>2</u> C= <u>N</u> - N=C:PHE773 (Cation-pi)
<b>FB9</b>	-7,9	CHO:THR362; CHO:GLY601; CHO:ASP602 (LH) Anel aromático central:LYS471; Anel aromático central:ARG534 (Cation-pi)	-6,3	Ar'-COO- Ar:THR787 (LH) <u>Ar'</u> -COO- Ar:PHE773 (empilhamento de aneis em T)
<b>Ouabaína</b>	-	-	-8,7	-

Fonte: Laboratório de Fitoquímica, Unifal/MG.

Considerando a interação dos ligantes com o modelo 1, com o qual se avaliou a interação nas proximidades do sítio do ATP, observou-se que o composto FB9 é o que apresenta maior potencial de se ligar a essa região por formar o complexo de menor energia com a enzima. Como pode ser visto Figura 8, as poses assumidas

pelos três compostos são similares e tendem a explorar a posição assumida pelo grupo difosfato da estrutura do ADP comparada.

Figura 8 - Interação dos derivados de eugenol com a subunidade alfa da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase de *S. mansoni* (modelo 1). A) Representação em superfície da enzima e destaque (tracejado vermelho) da região de interação dos ligantes estudados. B) Representação em fita da enzima e destaque (tracejado vermelho) da região de interação dos ligantes estudados. C) Destaque para região de interação dos derivados eugenólicos (carbonos em branco) e posição relativa à posição de interação do ADP (carbonos em verde) encontrada para a estrutura PDB 3WGU.

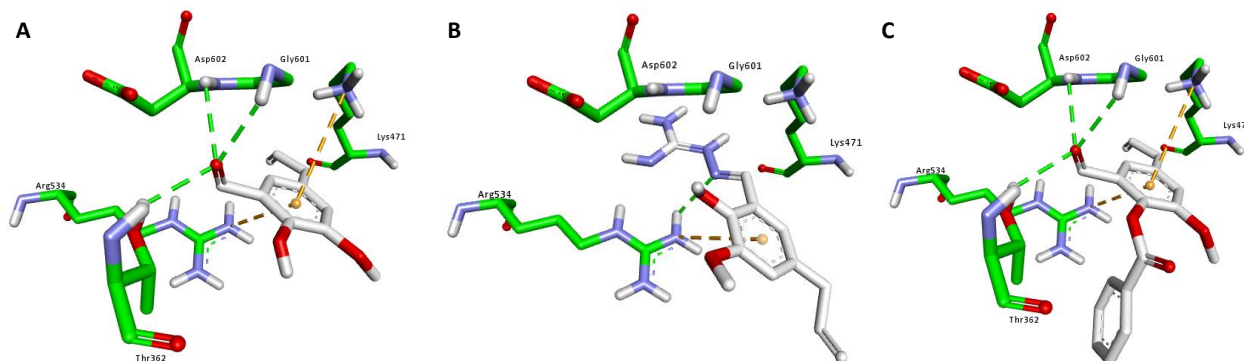


Fonte: Laboratório de Fitoquímica, Unifal/MG.

Em relação às interações encontradas entre cada um dos derivados e o modelo 1 (Tabela 1), não é possível observar uma diferença significativa entre as interações polares possíveis, como destacadas na Figura 9. As interações polares encontradas nos três complexos envolvem ligações de hidrogênio e do tipo cátion-pi. Os compostos FB1 e FB9 posicionam-se no sítio estudado de formas muito similares e, por isso, interagem com os mesmos resíduos de aminoácidos: THR362, GLY601 e ASP602 por ligação de hidrogênio e LYS471 e ARG534 por interação do tipo cátion-pi. Já para o composto FB4, observa-se a possibilidade de formação de apenas uma ligação de hidrogênio e uma do tipo cátion-pi com o resíduo de ARG534. Apesar disso, esse é um fator que não prejudica a estabilidade do complexo enzima-ligante quando se compara as energias dos complexos FB4-enzima e FB1-enzima. Já quando comparamos a energia desses dois complexos com a do complexo FB9-enzima, observa-se que a introdução do segundo sistema aromático para contribuir significativamente para a interação com o alvo. Como mostrado na Figura 10, o anel aromático do éster de FB9 parece assumir uma posição em um bolso formado pelos

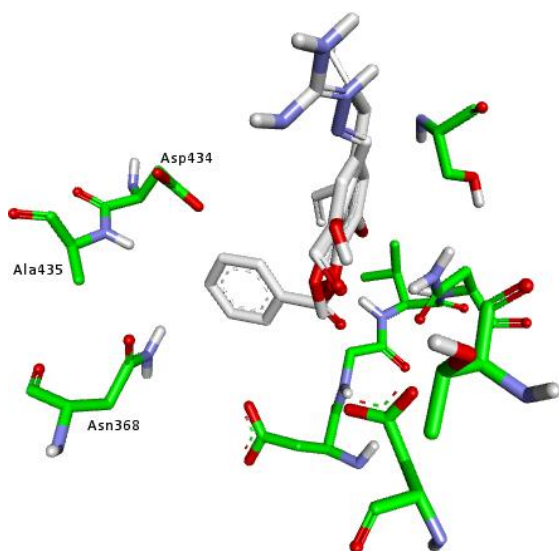
resíduos de aminoácidos ASN368, ASP434 E ALA435, o que pode estar interferindo na energia final de ligação do composto à enzima.

Figura 9 - Interação dos derivados de eugenol FB1 (A), FB4 (B) E FB9 (C) (carbonos em branco) com o sítio catalítico da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase de *S. mansoni* (modelo 1 – carbonos em verde). Interações do tipo cátion- $\pi$  são mostradas como linha tracejada de cor amarela e ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas verdes.



Fonte: Laboratório de Fitoquímica, Unifal/MG.

Figura 10 - Interação dos derivados de eugenol FB1, FB4 e FB9 (carbonos em branco) com o sítio catalítico da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase de *S. mansoni* (modelo 1 – carbonos em verde) destacando os aminoácidos envolvidos em interações de Van der Waals com os ligantes.



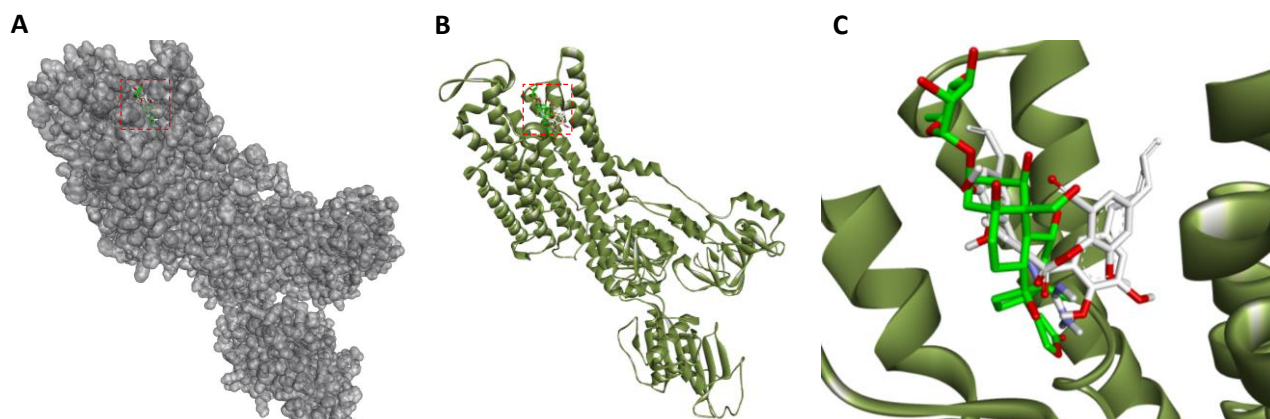
Fonte: Laboratório de Fitoquímica, Unifal/MG.

Considerando a interação dos ligantes com o modelo 2, com o qual se avaliou a interação nas proximidades do sítio da ouabaína, observou-se que o composto FB9

novamente é o que apresenta maior potencial de se ligar a essa região por formar o complexo de menor energia com a enzima. Como pode ser visto Figura 11 as poses assumidas pelos três compostos são bem particulares. Ao se comparar a pose dos três derivados com a assumida pela ouabaína, utilizando a posição por ela assumida no sítio ativo da estrutura PDB 3A3Y, vê-se que o composto FB4 é o que mais se assemelha em termos de regiões exploradas.

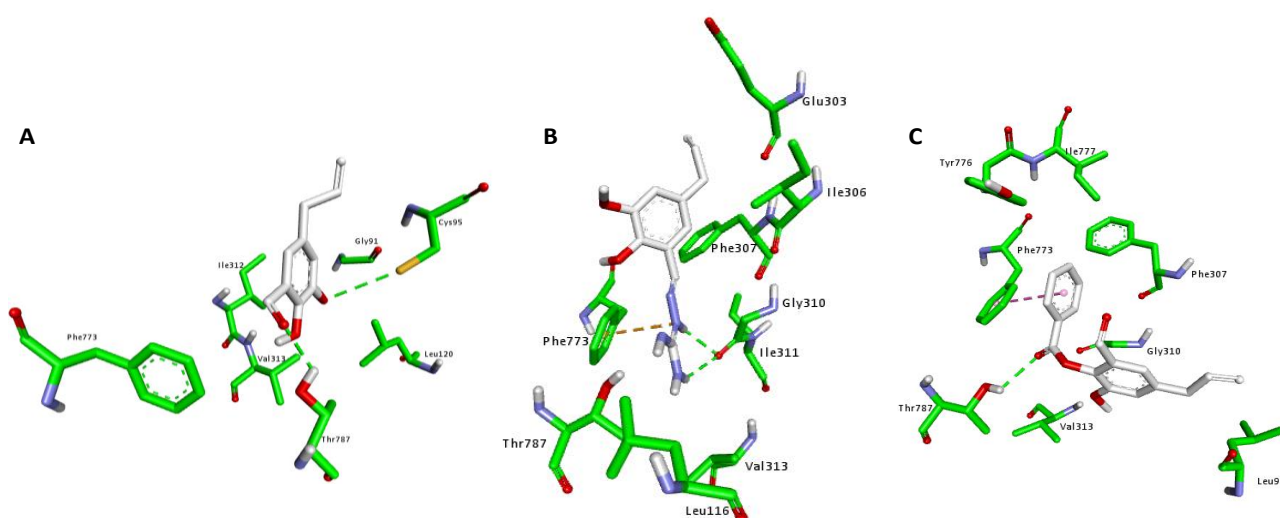
Diferentemente do que se observava nos complexos formados com o modelo 1, os complexos encontrados entre os derivados de eugenol e o modelo 2 se formam pelo estabelecimento de ligações polares diversas entre eles, como pode ser visto na Tabela 1. Para o composto FB1, é possível a formação de ligações de hidrogênio e Van der Waals, considerando a pose assumida pelo composto no sítio estudado (Figura 11A). Na região onde ficou encaixada, a cadeia alílica do eugenol parece não contribuir para interações de Van der Waals com a enzima, o que poderia justificar a alta energia de ligação encontrada para esse complexo e sua menor estabilidade. Em FB4, o grupo nitrogenado na estrutura é que parece nortear o posicionamento do ligante no sítio estudado, promovendo interações do tipo cátion-pi e de hidrogênio (Figura 11B). Nesse caso, o anel aromático e sua cadeia alílica estão circundados por aminoácidos com que podem realizar interações de Van der Waals, o que também pode ter contribuído para aumentar a estabilidade e consequentemente reduzir a energia de ligação do complexo com a enzima. No complexo entre FB9 e modelo 2, observa-se que, assim como em FB4, é o substituinte a mais que norteia o encaixe. Nesse caso, o anel aromático e a carbonila do éster podem realizar interações do tipo empilhamento pi em T e ligação de hidrogênio, respectivamente, com a enzima. Além disso, é possível também observar diferentes aminoácidos ao redor dos grupos de característica hidrofóbica na estrutura, o que pode contribuir para uma boa interação via ligações de Van der Waals.

Figura 11 - Interação dos derivados de eugenol com a subunidade alfa da Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase de *S. mansoni* (modelo 2). A) Representação em superfície da enzima e destaque (tracejado vermelho) da região de interação dos ligantes estudados. B) Representação em fita da enzima e destaque (tracejado vermelho) da região de interação dos ligantes estudados. C) Destaque para região de interação dos derivados eugenólicos (carbonos em branco) e posição relativa à posição de interação da ouabaína (carbonos em verde) encontrada para a estrutura PDB 3A3Y.



Fonte: Laboratório de Fitoquímica, Unifal/MG.

Figura 12 - Interação dos derivados de eugenol FB1 (A), FB4 (B) E FB9 (C) (carbonos em branco) com o sítio da ouabaína na Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase de *S. mansoni* (modelo 2 – carbonos em verde). Interação do tipo cátion-pi é mostrada como linha tracejada de cor amarela, ligações de hidrogênio são mostradas como linhas tracejadas verdes e empilhamento pi em T é mostrada como linha tracejada rosa.



Fonte: Laboratório de Fitoquímica, Unifal/MG.

Com base nesses estudos, não é possível dizer com convicção qual é realmente a região de interação desses compostos com a enzima, nem mesmo se



realmente interferem com alvo ou apenas com ele, por conta dos valores de energia de ligação, que foram medianos. Pelos resultados de energia de ligação, há uma maior afinidade deles pelo sítio do ATP quando comparado com a região de interação da ouabaína no canal da enzima. Comparados com a ouabaína, a energia de ligação é bem maior, o que mostra uma menor afinidade por essa região em relação a esse composto.

### 5.3 ANÁLISE BIOMOLECULAR

#### **5.3.1 Avaliação da atividade do sistema excretor dos vermes adultos de *S. mansoni* exposto aos derivados eugenólicos após marcação com a sonda Resorufina**

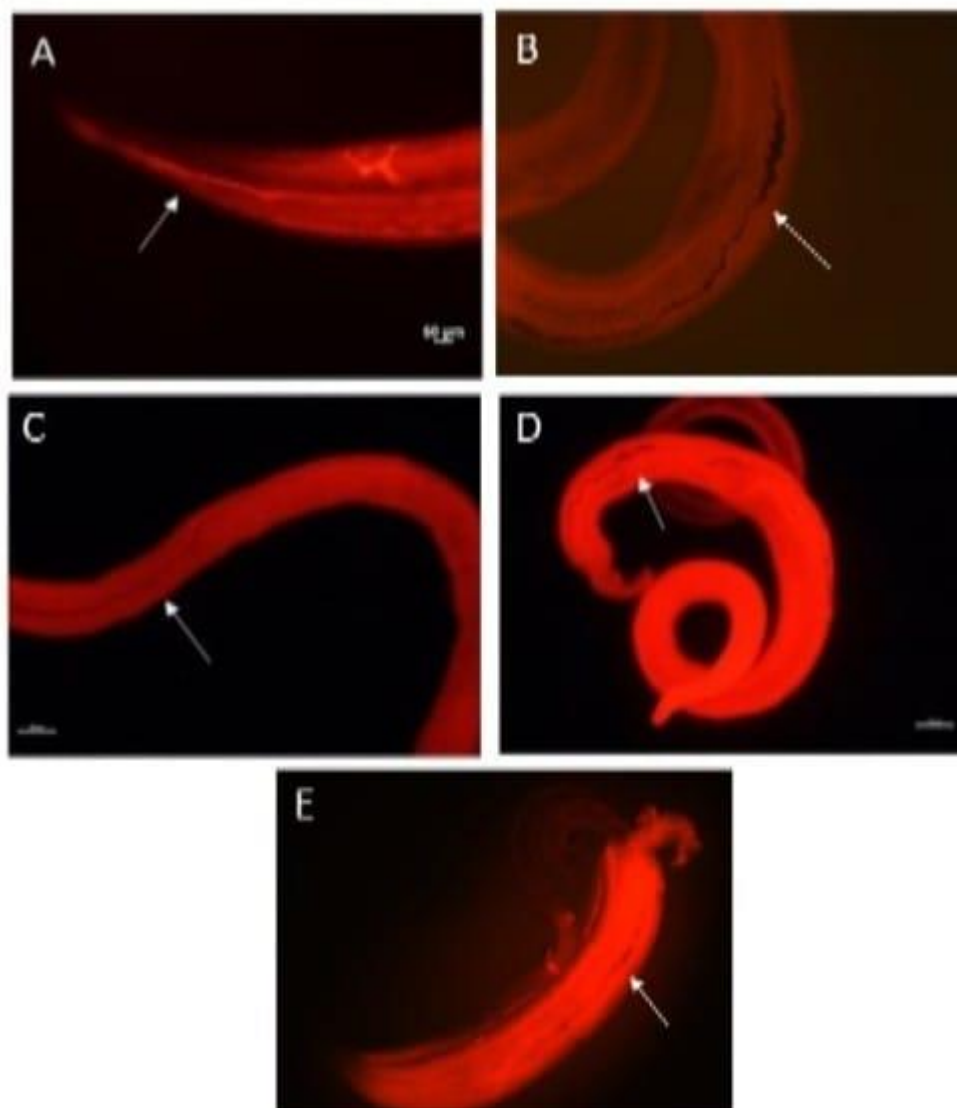
A atividade dos derivados eugenólicos ante o sistema excretor dos parasitos foi avaliada por meio de métodos moleculares utilizando a sonda Resorufina. Conforme nossos resultados, após a marcação com a sonda, fica evidente o funcionamento normal do sistema excretor dos vermes adultos de *S. mansoni* nas imagens (FIGURA 13, imagem A) exposto apenas ao controle RPMI, onde pode ser observada a fluorescência delimitada ao longo do parasito ao expulsar a sonda do organismo. Os parasitos expostos ao PZQ 2 µg/ml (FIGURA 13, imagem E) apresenta um padrão de fluorescência diferenciado, com emissão de fluorescência difundida por todo o corpo, indicando que o sistema excretor estava inativo. Estes resultados estão em conformidade com o trabalho de Couto et al. (2010) de avaliação da atividade do PZQ em vermes adultos de *S. mansoni* susceptíveis e não susceptíveis a droga.

Nos parasitos expostos ao FB1, FB4 e FB9 (FIGURA 13, imagem B, C e D) o resultado observado foi semelhante ao dos vermes expostos a PZQ, indicando que os derivados eugenólicos também foram capazes de interferir na atividade do sistema excretor, inativando-o, provavelmente por inibição da P glicoproteína.

Portanto, após a marcação com a sonda pôde-se observar que os derivados eugenólicos inibiram a atividade do sistema excretor dos parasitos. Este resultado pode ser constatado pela difusão da sonda em toda extensão do parasito e a ausência

de fluorescência ao longo do sistema excretor; sistema pelo qual normalmente estaria ativo expulsando a sonda do organismo (FIGURA 13).

Figura 13 - Marcação de danos no sistema excretor de vermes adultos pela sonda Resorufina



Fonte: da autora

Legenda: A: verme adulto macho exposto ao RPMI com marcação fluorescente. B: verme exposto ao FB1. C: fêmea exposta ao FB4. D: macho exposto ao FB9. E: casal de vermes exposto ao PZQ (controle positivo) com marcação fluorescente difundida por todo organismo do parasito. Ambos os derivados eugenólicos com seus respectivos ED<sub>100</sub>.

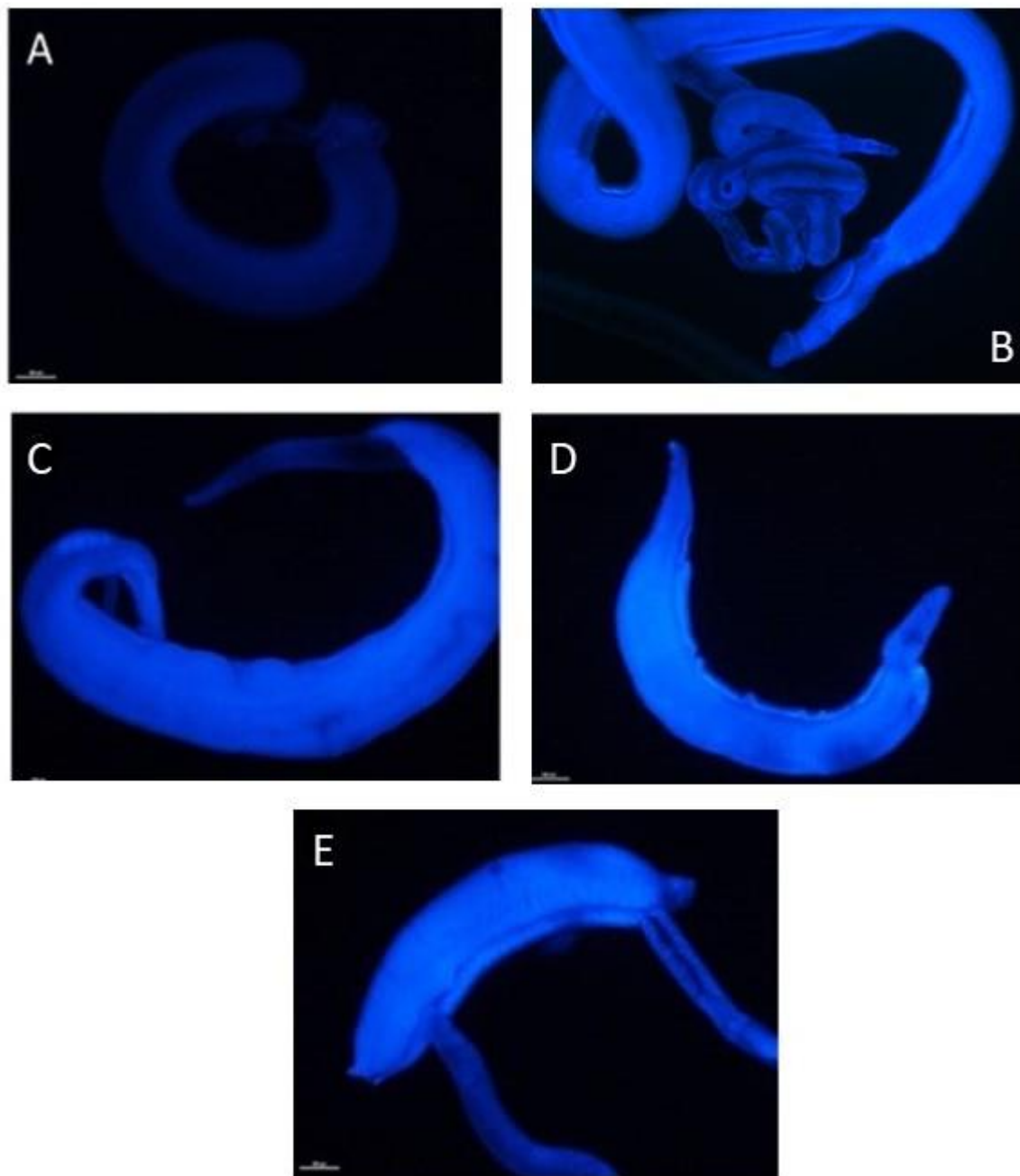
Haja vista a importância que o sistema excretor e o tegumento do verme adulto de *S. mansoni* apresentam frente ao mecanismo de escape do parasito (SATO et al., 2004; VAN HELLEMOND et al., 2006), analisar se o composto testado os compromete de alguma maneira se torna pertinente. Neste contexto, os marcadores moleculares surgem como ferramentas para comprovar possíveis alterações e danos nestas estruturas. Castro et al. (2016) demonstraram a atividade terapêutica *in vitro* contra vermes adultos do *S. mansoni* dos extratos, frações e principais alcalóides de piperidina substituídos com 3-hidroxi-2,6-dialquil das flores de *Senna spectabilis*, onde verificaram efeitos tóxicos, incluindo paralisia dos vermes adultos, inibição da atividade secretora, lesões tegumentares e atividade cercaricida.

### **5.3.2 Avaliação de danos no tegumento de vermes adultos expostos aos derivados eugenólicos *in vitro* usando a sonda Hoechst 33258**

Observou-se que os derivados eugenólicos, tiveram ação no tegumento dos vermes adultos provocando lesões. Tal resultado pode ser comprovado pela intensa fluorescência emitida pela sonda nas regiões danificadas (FIGURA 14). Na figura A podemos observar que não há marcação fluorescente indicando que a integridade da membrana dos parasitos incubados o meio RPMI-1640 estão preservadas. As imagens 14 B, C e D ilustram os parasitos expostos ao FB1, FB4 e FB9, respectivamente.

Os parasitas incubados com o PZQ (FIGURA 14 – E), apresentaram forte fluorescência em toda sua extensão, o que vai de encontro com os achados de Cioli et al. (2014) a respeito do seu mecanismo de ação (modificações superficiais no tegumento). Nas três imagens (B, C e D) houve marcação fluorescente comprovando que tais substâncias causam lesões no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni*, sobretudo quando se compara ao fármaco modelo – PZQ. Este resultado corrobora com as lesões tegumentares observadas nas análises anteriores pelo microscópio invertido, onde via-se bolhas no tegumento, que por sua vez, indicava lesão. Em um outro momento, Couto et al. (2010) mostraram por meio da sonda Hoechst 33258 que o PZQ causa intenso dano tegumentar aos parasitos, corroborando assim, com os dados mostrados no nosso trabalho.

Figura 14 - Marcação de lesões de tegumento pela sonda Hoechst 33258



Fonte: da autora

Legenda: A: casal incubado com o meio RPMI-1640. B: casal incubado com FB1. C: casal exposto ao FB4. D: macho exposto ao FB9. E: casal exposto ao PZQ com marcação fluorescente em toda sua extensão. Ambos os derivados eugenólicos com seus respectivos ED<sub>100</sub>.

A sonda Hoechst 33258 possui perfil hidrofílico e somente emite fluorescência quando consegue se ligar ao DNA das células. Portanto, para que isto ocorra, é

preciso haver danos/lesões no tegumento do parasito, para que assim, a sonda consiga se difundir e emitir fluorescência. Dessa forma, esta sonda é característica por ser um parâmetro de avaliação da integridade da membrana (COUTO et al., 2010).

Já foi descrito na literatura a hipótese de que as alterações morfológicas que uma substância é capaz de causar no parasita, sobretudo na membrana sarcoplasmática e no tegumento do verme, possam ser acompanhadas por um aumento da exposição a antígenos na superfície do mesmo. Por sua vez, essas alterações foram identificadas através do auxilio de diferentes técnicas qualitativas e conectadas à resposta imune do hospedeiro. Diante disso, o tegumento dos vermes adultos tem sido atraente alvo no desenvolvimento de novas substância esquistossomicidas (MANNECK et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014).

Diante do exposto, comprova-se que além de provocar danos no sistema excretor, os derivados eugenólicos danificam consideravelmente o tegumento do verme adulto.

Por se tratar de seres eucariontes, tanto os parasitos quanto seus hospedeiros compartilham de diversas características bioquímicas e moleculares. Do ponto de vista de prospecção de fármacos, este fato se configura como um obstáculo para pesquisadores que atuam na área. Uma das razões para tal é que se deve ter em mente a limitação de encontrar protótipos que sejam simultaneamente eficazes contra o parasito, mas não tóxicos para os seres humanos (WINK, 2012).

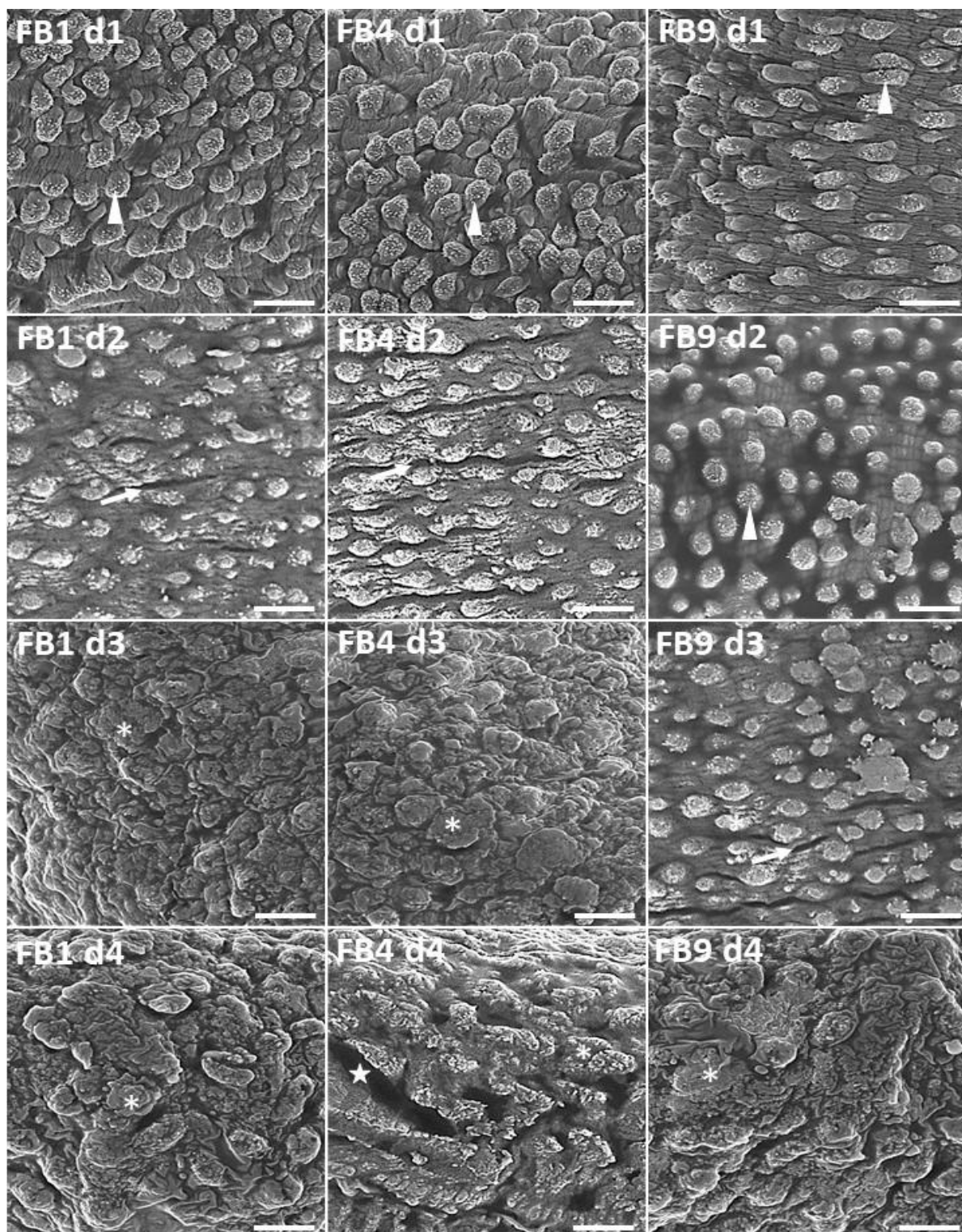
#### 5.4 ANÁLISE DO DANO TEGUMENTAR INDUZIDO POR DERIVADOS EUGENÓLICOS

Conforme indicado pelas imagens MEV (FIGURA 15), todos os derivados eugenólicos (FB1, FB4 e FB9) avaliados tinham um efeito tóxico dose dependente no tegumento dos vermes adultos de *S. mansoni*. Alterações não-microestruturais, alterações nos sulcos, tubérculos e espículas foram observadas no tegumento em vermes tratados com FB1, FB4 e FB9 em 62, 41 e 100 µg / mL, respectivamente. Nas doses abaixo do ED<sub>50</sub> (FB1 D1 E D2; FB4 D1 E D2; FB9 D1 E D2, vide TABELA 2) foram observadas a redução ou desaparecimento de espículas, achatamento de

tubérculos e bandas de contração tegumentar. Em doses acima do ED<sub>50</sub> (FB1 D3 E D4; FB4 D3 E D4; FB9 D3 E D4), os tratamentos induziram dano tecidual acentuado, evidenciado como o colapso completo dos tubérculos, o desaparecimento de espículas e ranhuras tegumentares. Adicionalmente, erosão tegumentar foi identificada em vermes expostos a dose alta de FB4 (80 µg / mL). Não foi observado nas imagens do grupo controle diferença em relação as doses mais baixas do tratamento (dados não mostrados).

Apesar da utilidade da microscopia óptica invertida para avaliar os efeitos das substâncias testadas sobre os vermes adultos de *S. mansoni*, a mesma não permite detalhar modificações tegumentares no parasita. Neste estudo, uma análise qualitativa sobre o dano tegumentar das amostras no tratamento *in vitro* feita através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) e assim foi possível demonstrar os danos causados nesta estrutura tão importante para o parasita. É sabido que o MEV é empregado por vários estudiosos na tentativa de elucidar o mecanismo de ação de drogas/compostos usados no tratamento experimental da esquistossomose (OLIVEIRA et al., 2014).

Figura 15 - Fotomicrografias eletrônicas de varredura de vermes adultos de *Schistosoma mansoni* tratados com diferentes doses de derivados eugenólicos. Imagens representativas do final das 192h (período de observação) após o contato dos parasitos com diferentes doses de FB1, FB4 e FB9.



Legenda: Cabeça e seta: Tubérculos com espículas. Seta: Bandas de contração. Asterisco: Tubérculos colapsados em degeneração. Estrela: Erosão do tegumento. FB1 e FB4, perda completa dos sulcos do tegumento a partir da dose 3 (d3).

## 6 CONCLUSÃO

Através dos nossos dados, foi possível observar com base nos parâmetros parasitológicos analisados, por meio de ensaios *in vitro* e *in sílico*, que os derivados eugenólicos apresentam atividade esquistossomicida contra os vermes adultos de *S. mansoni*, linhagem LE. Nesta perspectiva, podemos levantar algumas hipóteses sobre o mecanismo de ação das amostras avaliadas, como por exemplo:

1. Através da análise da motilidade, tem-se a hipótese da ação das amostras sobre *S. mansoni*;
2. Através da análise do acasalamento e da oviposição, nossas amostras podem ter atuado suprimindo a oviposição da eliminação de ovos;
3. Pode ter ocorrido atuação sobre o tegumento dos parasitas, ocasionando lesões estruturais, e conseqüentemente, a morte dos vermes;
4. Pode ter ocorrido atuação sobre o sistema excretor dos vermes de *S. mansoni*, comprometendo a expressão de proteínas de transportes, responsáveis pela excreção de fármacos e metabólitos do parasita;
5. Pode ter havido inibição, em algum momento, do canal de sódio, no entanto, não há nada conclusivo. Há a possibilidade de nossas amostras terem atuarem no alvo, mas não de forma seletiva.

Finalmente, pode-se concluir que os derivados eugenólicos atuam sobre o parasito de forma mais ativa quando atuam no tegumento dos vermes adultos do *S. mansoni*, pois, tanto na microscopia eletrônica de varredura, quanto na microscopia de fluorescência observou-se nítido efeito danoso, demonstrando, finalmente, que os derivados eugenólicos causam lesão nessa estrutura tão importante para o parasita, o que por sua vez pode ter ocasionado em todos os outros efeitos mencionados neste trabalho, bem como a influência na motilidade, no acasalamento e oviposição e finalmente na morte dos parasitas.



## REFERÊNCIAS

ABATH, F. G.; WERKHAUSER, R. C. The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. **Parasite immunology**, v. 18, n. 1, p. 15–20, 1996.

ABDEL-RAHMAN, F.H.; ALANIZ, N.M.; SALEH, M.A. Nematicidal activity of terpenoids. **J Environ Sci Health B.**, v. 48, n. 1, p. 16-22, 2013.

ADLER, Carolyn. Tropical Disease: Dissecting the schistosome cloak. Cornell University, United States. **INSIGHT**, Apr. 2018.

AHMAD, A. et al. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. **Microb Pathog**, v. 48, p.35–41, 2010.

ALBUQUERQUE, A.C.; SORENSON, A. L.; CARDOSO, J.H.L. Effects of essential oil of *Croton zehntneri*, and of anethole and estragole on skeletal muscles. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, p. 41-49, Nov. 1995.

ANDREWS, Paul. A summary of the efficacy of praziquantel against schistosomes in animal experiments and notes on its mode of action. **Drug Res.**, v. 31, p. 538–541, 1981.

BAGAVAN et al. *In vitro* antimalarial activity of medicinal plant extracts against *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Research**, v. 108, n. 1, p.15-22, set. 2011.

BALKOM, B. W. M. V. et al. Mass Spectrometric analysis of the *Schistosoma mansoni* tegumental sub-proteome. **Journal of Proteome Research**, p. 958–966 mai. 2005.

BASCH, Paul. **Schistosomes: development, reproduction, and host relations**. Oxford: University Press, 1991.

BENNETT, J.; BUEDING, E. Localization of biogenic amines in *Schistosoma mansoni*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 39, p. 859-867, 1971.

BENNIS, S. et al. Surface alteration of *Saccharomyces cerevisiae* induced by thymol and eugenol. **Lett Appl Microbiol.**, v. 38, p.454–8, 2004.

BERGQUIST, Nils Robert. Schistosomiasis: from risk assessment to control. **Trends Parasitology**, v. 18, p. 309-314, 2002.

BESIER, P. et al. Diagnosis, Treatment and Management of *Haemonchus contortus* in Small Ruminants. **Advances in Parasitology**, v. 93, May. 2016.

BINU, P. et al.: Protective Effects of Eugenol against Hepatotoxicity Induced by Arsenic Trioxide: An Antileukemic Drug. **Iran J Med Sci.**; v. 43, n. 3, p. 305–312, 2018.

BRAGA P. et al. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 396–400, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica, 4. ed. Brasília, 2014.

BRINDLEY, P. J.; HOTEZ, P. J. Break out: urogenital schistosomiasis and *Schistosoma haematobium* infection in the post-genomic era. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 7, n. 3, p. e1961, 2013.

BURKE, M. L. et al. Immunopathogenesis of human schistosomiasis. **Parasite Immunol.**, v. 31, p. 163–176, 2009.

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Lett Appl Microbiol**, v. 36, n. 3, p.162-7, 2003.

CASTRO, A. T. et al. *In vitro* evaluation of the schistosomicidal effect of the extracts, fractions and major 3-hydroxy-2,6-dialkyl-substituted piperidine alkaloids from the flowers of *Senna spectabilis* (Fabaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 17, p. 4197-4204, set. 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Schistosomiasis Infection**. [2018]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/schistosomiasis/index.html>. Acesso em: 18 jun. 2019.

CHITSULO, L.; LOVERDE, P.; ENGELS, D. Schistosomiasis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, p.12–13, jan. 2004.

CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: Praziquantel forever? **Molecular and**

**Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 1, p. 23–29, 2014.

CORSSO, C.; COSTA, R. R.; VARANDA, W. A. Canais para cálcio dependentes de voltagem. In: RESENDE, Rodrigo. **Sinalização de cálcio: bioquímica e fisiologia celulares**. São Paulo: SARVIER, 2012. Cap. 7, p. 123-177.

COUTO, F. F. B. et al. Use of fluorescent probes as a useful tool to identify resistant *Schistosoma mansoni* isolates to praziquantel. **Parasitology**, v. 137, n. 2006, p. 1791–1797, 2010.

DA SILVA, S. P.; NOËL, F. Time-course of the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni* attachment *in vitro*: comparison with its effects on worm length and motility. **Parasitology Research**, v. 81, p. 544-548, 1995.

DA SILVA, S. P.; NOËL, F. Time-course of the effect of praziquantel on *Schistosoma mansoni* attachment *in vitro*: comparison with its effects on worm length and motility. **Parasitology Research**, v. 81, p. 544-548, 1995.

DAY, T. A. et al. Functional ryanodine receptor channels in flatworm muscle fibres. **Parasitology**, v. 120, p. 417-422, 2000.

DAY, T. A. et al. Platyhelminth FMRFamide-related peptides (FaRPs) contract *Schistosoma mansoni* (Trematoda Digenea) muscle fibers *in vitro*. **Parasitology**, v. 109, p. 455-459, 1994.

DAY, T. A.; BENNETT, J. L.; PAX, R. A. Serotonin and its requirement for maintenance of contractility in muscle fibres isolated from *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 108, p. 425-432, 1994.

DE OLIVEIRA, R. N. et al. *Schistosoma mansoni*: *In vitro* schistosomicidal activity of essential oil of *Baccharis trimera* (less) DC. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 135–143, 2012.

DEVI, K. P. et al. Eugenol alters the integrity of cell membrane and acts against the nosocomial pathogen *Proteus mirabilis*. **Arch Pharm Res**, v. 36, p. 282–92, 2013.

DI PASQUA, R. et al. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **J Agric Food Chem**, v. 55, p. 4863–70, 2007.

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

DOENHOFF, M.J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 21, n. 6, p. 659-67, 2008.

DUTTA, B.; BORBORAH AND, K.; BORTHAKUR, S. K. Aromatic plants containing essential oil component-linalool, eugenol and methyl chavicol reported from North-East India Barnali. **J. Nat. Prod. Plant Resour.**, v. 5, n. 1, p. 6-10, Jan. 2015.

EL-DIN, Ahmed Sharaf. Molluscicidal effect of three monoterpenes oils on schistosomiasis and fascioliasis vector snails in Egypt. **J Egypt Soc Parasitol.**, v. 36, n. 2, p. 599-612, Aug. 2006.

EL-KADY, A. M. et al. Eugenol, a potential schistosomicidal agent with anti-inflammatory and antifibrotic effects against *Schistosoma mansoni*, induced liver pathology. **Infect Drug Resist.**; v. 12, p. 709–719, 2019.

FAGHIRI, Z. et al. The tegument of the human parasitic worm *Schistosoma mansoni* as an excretory organ: the surface aquaporin SmAQP is a lactate transporter. **PLoS One**, v. 5, p. e10451, 2015.

FETTERER, R. H.; PAX, R. A.; BENNETT, J. L. Praziquantel, potassium and 2,4-dinitrophenol: analysis of their action on the musculature of *Schistosoma mansoni*. **European Journal of Pharmacology**, v. 64, p. 31-38, 1980.

FETTERER, R. H.; PAX, R. A.; BENNETT, J. L. Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> transport, motility and tegumental membrane potential in adult male *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 82, p. 97-109, 1981.

FOUND, A. A.; YACOUBI, M. T. Mechanisms underlying the protective effect of eugenol in rats with acute doxorubicin cardiotoxicity. **Arch Pharm Res.**, v. 34, n. 5, p. 821-8, 2011.

FREITAS, T. C. et al. TGF-beta signaling controls embryo development in the parasitic flatworm. *Schistosoma mansoni*. **PLOS Pathog**, v. 3, p. 489–502, 2007.

FUJISAWA, S.; MURAKAMI, Y. Eugenol and Its Role in Chronic Diseases. **Adv Exp Med Biol.**, v. 929, p. 45-66., 2016.

GALANTI, S. E., HUANG, S.C.C., PEARCE, E.J. Cell death and reproductive regression in female *Schistosoma mansoni*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 6, p. e1509, 2002.

GENTILE, R. et al. Uma revisão sobre a participação do rato d'água nectomys squamipes na dinâmica de transmissão da esquistossomose mansônica: um Estudo multidisciplinar de longo prazo em uma área endêmica. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 3, p. 711-725, 2010.

GRECCO, S. S. et al. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of dehydrodieugenol isolated from *Nectandra leucantha* (Lauraceae) and its methylated derivative against *T. cruzi*. **Phytomedicine**, v 24, p. 62-67, 2017.

GRECCO, Simone dos Santos. Prospecção químico-farmacológica de *Nectandra leucantha* (Lauraceae): seleção de moléculas com atividade antiparasitária. **Repositório Institucional da UFABC**, 2016.

GREENBERG, Robert. Schistosome ABC multidrug transporters: From pharmacology to physiology. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**, v. 4, n. 3, p. 301–309, Dec, 2014.

GRIMES, J. E. T. et al. The relationship between water, sanitation and schistosomiasis: a systematic review and meta-analysis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 8, e3296, 2014.

HAN, Z. et al. *Schistosoma* genomics: new perspectives on schistosome biology and host- parasite interaction. **Annual Review of Genomics Human Genetics**. v. 10, p. 211-240, 2009.

HOCKLEY, D.J. *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. **Int. J. Parasitol.**; v. 3, n. 1, p. 13-20, 1973.

HOTEZ, P. J. et al. Multivalent anthelmintic vaccine to prevent hookworm and schistosomiasis. **Expert Review of Vaccines**, v. 7, n. 6, p. 745-752, Aug, 2008.

HOTEZ, P. J. et al.: The Neglected Tropical Diseases: The ancient afflictions of stigma and poverty and the prospects for their control and elimination. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, Boston, vol. 582, May, 2006.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Front Microbiol**, p. 3:12, 2012.

ISLAMUDDIN, M. et al. Immunotherapeutic Potential of Eugenol Emulsion in Experimental Visceral Leishmaniasis. **PLoS – Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. e0005011, Oct. 2016.

KAMEL, E. G. et al. Parasitological and biochemical parameters in *Schistosoma mansoni*-infected mice treated with methanol extract from the plants *Chenopodium ambrosioides*, *Conyza dioscorides* and *Sesbania sesban*. **Parasitology International**, v. 60, n. 4, p. 388–392, 2011.

KATIKI, L. M. et al. Synergistic interaction of ten essential oils against *Haemonchus contortus* *in vitro*. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 47–51, July. 2017.

KIM, Y. G. et al. Essential Oils and Eugenols Inhibit Biofilm Formation and the Virulence of *Escherichia coli* O157:H7. **Sci Rep.**, v. 6, p. 36377, 2016.

KOHN, A. B. et al. Schistosome calcium channel  $\beta$  subunit: unusual modulatory effects and potential role in the action of the antischistosomal drug praziquantel. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 36.873-36.876, 2001.

KOHN, A. B. et al. Specific sites in the beta interaction domain of a schistosome  $Ca^{2+}$  channel  $\beta$  subunit are key to its role in sensitivity to the anti-schistosomal drug praziquantel. **Parasitology**, v. 127, p. 349-356, 2003.

KOJIMA, Somei. Immunoregulation and parasitic infections. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v 18, p. 319–324, 1997.

KUMAR, P.; SINGH, V.K.; SINGH, D.K. Combination of molluscicides with attractant carbohydrates and amino acids in bait formulation against the snail *Lymnaea acuminata*. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.**, v. 15, n. 5, p. 550-5, mai. 2011.

KUSEL, J. K.; AL-ADHAMI, B. H.; DOENHOFF, M. J. The schistosome in the mammalian host: understanding the mechanism of adaptation. **Parasitology**, v. 134, p. 1477-1526, 2007.

LEE, K. S. e TSIEN, R. W. Reversal of current through calcium channels in dialysed single heart cells. **Nature**, v. 297, p. 498-501, 1983

LI, H.Q. et al. Chemical composition and nematicidal activity of essential oil of *Agastache rugosa* against *Meloidogyne incognita*. **Molecules**, v. 18, n. 4, p. 4170-80, abr. 2013.

LIMA, S.F. et al. Altered behaviour of carbohydrate-bound molecules and lipids in areas of the tegument of adult *Schistosoma mansoni* worms damaged by praziquantel. **Parasitology**, v. 109: 469-477, 1994.

LITTLEWOOD, Timothy. The evolution of parasitism in flatworms. In: Maule, A.G., Marks, N.J. (Ed.). *Parasitic flatworms: molecular biology, biochemistry, immunology and physiology*, [s. l.: s. n.], 2006.

LOUKAS, A.; TRAN. M.; PEARSON, M.S.: Schistosome membrane proteins as vaccines. **International Journal for Parasitology**, v. 37, p. 257-263, 2007.

LOVERDE, P.T. Presidential address. Sex and schistosomes: an interesting biological interplay with control implications. **Journal Parasitology**, v. 88, p. 3–13, 2002.

MAGALHÃES, L. G. et al. *In vitro* schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology research**, v. 104, n. 5, p. 1197–201, Apr. 2009.

MAGALHÃES, L. G. et al. *In vitro* schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from *Dryopteris* species against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitology Research**, v. 106, p. 395–401, 2010.

MANNECK, Y. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 85–98, 2010.

MARCHESE et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 668-689, 2017.

MATTOS, A. C. et al. Activity of praziquantel on *in vitro* transformed *Schistosoma mansoni* sporocysts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1, S283-287, 2006.

MEHER, G.; CHAKRABORTY, H. Influence of eugenol on the organization and dynamics of lipid membranes: a phase-dependent study. **Langmuir**, v. 34, n. 6, p. 2344-2351, 2018.

MEISTER, I. et al. Activity of praziquantel enantiomers and main metabolites against *Schistosoma mansoni*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 9, p. 5466-72, 2014.

MESSERLI, S. M. et al. *Schistosoma mansoni* P-glycoprotein levels increase in response to praziquantel exposure and correlate with reduced praziquantel Susceptibility. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 167, p. 54-59, 2009.

MILLER, F.H.; TULLOCH G.S.; KUNTZ R.E. Scanning electron microscopy of integumental surface of *Schistosoma mansoni*. **J. Parasitol.**; v. 58, n. 4, p. 693-698, 1972.

MOLYNEUX, D.H.; NANTULYA, V.M. Linking disease control programmes in rural Africa: a pro-poor strategy to reach Abuja targets and millennium development goals. **BMJ**, v. 328, p.1129–1132, 2004.

MORAIS, S. M. Thymol and eugenol derivatives as potential antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p. 6250-6255, Nov. 2014.

MUTH, S. et al. *Schistosoma mekongi* in Cambodia and Lao People's Democratic Republic. **Adv. Parasitol.**, v. 72, p. 179–203, 2010.

NAGABABU, E. et al. Assessment of Antioxidant Activity of Eugenol *In Vitro* and *In Vivo*. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 610, p. 165-180, Nov. 2010.

NECHAY, R.; HILLMAN, R.; DOTSON, J. Properties and drug sensitivity of adenosine triphosphatase from *S. mansoni*. **The Journal of Parasitology**, v. 66, p. 596-600, 1980.

NOËL, F.; PARDON, R. S. Vanadate sensitivity of Na<sup>+</sup>,K<sup>+</sup>-ATPase from *Schistosoma mansoni* and its modulation by Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> and Mg<sup>+</sup>. **Life Sciences**, v. 44, p. 1.677-1.683, 1989.

NOËL, F.; SOARES, R. *Schistosoma mansoni*: preparation and characterization of Na<sup>+</sup> K<sup>+</sup> - ATPase from tegument and carcass. **Experimental Parasitology**, v. 62, p.



298-307, 1986.

NOËL, F. et al. Control of calcium homeostasis in *Schistosoma mansoni*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 85-88, 2001.

NOËL, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade do adulto, *Schistosoma mansoni* & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar. CARVALHO, O. S., COELHO, P. M. Z. e LENZI, H. L., Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 207-244.

OLIVEIRA, F. A. et al. Responses of the surface membrane and excretory system of *Schistosoma mansoni* to damage and to treatment with praziquantel and other biomolecules. **Parasitology**, v. 132, p. 321-330, 2006

OLIVEIRA, L. M. B. et al. Anthelmintic activity of *Cocos nucifera* L. against sheep gastrointestinal nematodes. **Veterinary Parasitology**, v. 159, p. 55-59, Jan. 2009.

OLIVEIRA, R. N. Anthelmintic activity *in vitro* and *in vivo* of *Baccharis trimera* (Less) DC against immature and adult worms of *Schistosoma mansoni*, **Experimental Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 63–72, 2014.

OLIVEIRA, R. N. et al. Sesquiterpenes evaluation on *Schistosoma mansoni*: Survival, excretory system and membrane integrity. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 1-946, 2017.

OLOUNLADÉ, P.A. et al. *In vitro* anthelmintic activity of the essential oils of *Zanthoxylum zanthoxyloides* and *Newbouldia laevis* against *Strongyloides ratti*. **Parasitol Res.**, v. 110, n. 4, p. 1427-33, Sept. 2012.

PELLEGRINO, J. et al. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. XIII. Activity of praziquantel, na isoquinoline-pyrazino derivative, on mice, hamsters and *Cebus* monkeys. **Z Parasitenkd**, v. 52, p. 151-168, 1977.

PICA-MATTOCCIA et al. Cytochalasin D abolishes the schistosomicidal activity of praziquantel. **Experimental Parasitology**, v. 115, p. 344–351, 2007.

PICA-MATTOCCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to *in vivo* and *in vitro* praziquantel treatment. **International Journal for Parasitology**, v. 34, n. 4, p. 527–33, Mar. 2004.

PITT, Bertram. Diversity of calcium antagonists. **Clinical Therapeutics**, v. 19 Supplement 1, p. 3–17, 1997.

QUASTEL, M. R.; KAPLAN, J.G. Inhibition by ouabain of human lymphocyte transformation induced by phytohaemagglutinin *in vitro*. **Nature**, v. 13, n. 219(5150), p.198-200, July. 1968.

SANTORO, G. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Exp Parasitol.**, v. 116, n. 3, p. 283-90, July, 2007.

SANTORO, Giani França. ***Trypanosoma cruzi*: Investigação sobre óleos essenciais como potenciais agentes tripanocidas**. 2007. 107 f. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2007.

SATO, H.; KUSEL, J. R.; THORNHILL, J. Excretion of fluorescent substrates of mammalian multidrug resistance-associated protein (MRP) in the *Schistosoma mansoni* excretory system. **Parasitology**, v. 128, p. 43-52, 2004.

SATO, H.; KUSEL, J. R.; THORNHILL, J. Functional visualization of the excretory system of adult *Schistosoma mansoni* by the fluorescent marker resorufin. **Parasitology**, v. 125, n. 6, p. 527–35, Dec, 2002.

SCHINKEL, A H.; JONKER, J. W. Mammalian drug efflux transported of the ATP binding cassette (ABC) family: an overview. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 55, p. 3–29, 2003.

SHANG, X. F. et al. Acaricidal activity and enzyme inhibitory activity of active compounds of essential oils against *Psoroptes cuniculi*. **Veterinary Parasitology**, v. 267, p. 54-59, Mar. 2019.

SKOU, J. C. The influence of some cations on an adenosine triphosphatase from peripheral nerves. **Biochim Biophys Acta**, v. 23, n. 2, p. 394-401, Feb, 1957.

SMITHERS, S. R.; TERRY, R. J. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. **Parasitology**, v. 55, n. 4, p. 695–700, Nov. 1965.

SPEEDING, M.; PAOLETTI, R. Classification of calcium channels and modifying channel function. **Pharmacol Review**, v. 44, p. 363-376, 1992.

STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, n. 7, p. 411–25, July, 2006.

SWEADNER, Kathleen. Isozymes of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase. **Biochim Biophys Acta**, v. 988, n. 2, p. 185-220, May, 1989.

THOMPSON, D.P.; PAX, R.A.; BENNETT, J.L. Microelectrode studies of the tegument and subtegumental compartments of the male *Schistosoma mansoni*: an analysis of electrophysiological properties. **Parasitology**, v. 85, p. 163-178, 1982.

THORNHILL, J. et al. The uptake of macromolecules by cercariae during skin penetration and during *in vitro* transformation to schistosomula (*Schistosoma mansoni*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 105, 2009.

USTA, J. et al. Comparative study on the effect of cinnamon and clove extracts and their main components on different types of ATPases. **Sage Journals**.; v. 22 n. 7, p. 355-362, July. 2003.

UTZINGER, J. et al. From innovation to application: Social–ecological context, diagnostics, drugs and integrated control of schistosomiasis. **Acta Tropica**, v. 120, p. 121-137, Sept, 2011.

UTZINGER, J.; KEISER, J.: Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: common drugs for treatment and control. **Expert Opin Pharmacother**, v. 5, n 2, p 263-285, Mar, 2004.

VAN HELLEMOND, J. J. et al. Functions of the tegument of schistosomes: Clues from the proteome and lipidome. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 6, p. 691–699, 2006.

WHITE, Nicholas. Antimalarial drug resistance and combination chemotherapy. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 354, p. 739 -749, 1999.

WINK, Michael. Medicinal plants: A source of anti-parasitic secondary metabolites. **Molecules**, v. 17, p. 12771–12791, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Neglected tropical diseases**, 2004. Disponível em [https://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/). Acesso em: 05 abr. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. Genebra, 2002. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42588/WHO\\_TRS\\_912.pdf?sequence=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42588/WHO_TRS_912.pdf?sequence=1). Acesso em: 05 maio 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis**. Genebra: WHO, 2018. Disponível em <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>. Acesso em: 02 maio 2019.

XAVIER, A.M.L. et al. Morphological Tegument Alterations of adult *Schistosoma mansoni*, harbored in non-anti-helminthic treated, high-immune-tolerogenic and low-inflammatory mice. **Acta Tropica**, v. 116 p. 95-99, 2010.

XIAO, S.H., et al. Praziquantel-induced vesicle formation in tegument of male *Schistosoma mansoni* is calcium dependent. **The Journal of Parasitology**, v. 70, p. 177-179, 1984.

ZHOU, X. N. et al. Schistosomiasis japonica control and research needs. **Adv. Parasitol.**, v. 72, p. 145–178, 2010.

## ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFAL



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
 Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG  
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700, Alfenas/MG, CEP 37130-000  
 Fone: (35) 3299-1000, Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



### CERTIFICATE

We hereby certify that the proposal entitled "In vitro evaluation of the schistosomicidal activity of eugenolic derivatives using biochemical and molecular tools", registration number 25/2019, under the responsibility of Marcos José Marques, which implies production, maintenance or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except humans), for the purpose of scientific research (or teaching), is in compliance with Law no. 11794, published on October 8<sup>th</sup>, 2008, with Decree no. 6899, published on July 15<sup>th</sup>, 2009, and with the guidelines issued by the National Council on the Control of Animal Experimentation (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA), and was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA-UNIFAL) (Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas).

Purpose: ( ) Teaching	(X) Scientific research
Expiration date	01/01/2020
Species/strain/breed	Swiss mice / Outbred
Number of animals	30
Sex	Male/Female
Origin	Central Vivarium UNIFAL-MG

Alfenas, September 02, 2019.

Leonardo Augusto de Almeida PhD  
 CEUA/UNIFAL Coordinator