

JOSUÉ DE MORAES

**Efeito in vitro de extratos e
compostos naturais em
*Schistosoma mansoni***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2011

JOSUÉ DE MORAES

**Efeito in vitro de extratos e
compostos naturais em
*Schistosoma mansoni***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadores: Profa. Dra. Eliana Nakano
Profa. Dra. Toshie Kawao
(in memorian)

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Moraes, Josué de.

Efeito *in vitro* de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni* / Josué de Moraes. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Eliana Nakano.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Pesquisa de substâncias naturais com atividade moluscicida e esquistossomicida.

Versão do título para o inglês: *In vitro* effect of extracts and natural compounds on *Schistosoma mansoni*

Descritores: 1. *Schistosoma mansoni* 2. Esquistossomose
3. Atividade esquistossomicida 4. Anti-helmíntico 5. *In vitro*
6. Compostos e extratos de plantas I. Nakano, Eliana
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB058/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Josué de Moraes.

Título da Tese: Efeito *in vitro* de extratos e compostos naturais em
Schistosoma mansoni.

Orientador(a): Eliana Nakano.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

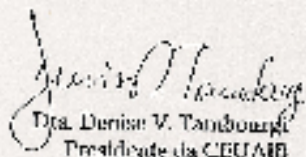
Av. Vital Brasil, 1500, CEP: 05503-900, São Paulo, SP, Brasil
Telefone: (55) (011) 7226 7222 - ramal 1106 Fax: (55) (011) 7226 1515

CERTIFICADO

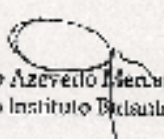
Certificamos que o Projeto intitulado "Ação de extratos e princípios ativos de Piperaceae e outras plantas em adultos de *Schistosoma mansoni*: efeito *in vitro* e *in vivo*", protocolo nº 415/07, sob a responsabilidade de Toshie Kawano e Josué de Moraes, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 12/09/2007.

"We certify that the Research entitled Effect of extracts and active substances of Piperaceae and other plants on adults of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo, protocol nº 415/07, under the responsibility of Toshie Kawano and Josué de Moraes, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 09/12/2007"

São Paulo, 12 de setembro de 2007.


Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:


Dr. Otávio Azevedo Merculante
Diretor do Instituto Butantan

Aos meus pais **Oscar** e **Dulce**, que
construíram a maravilhosa Família
Moraes, e aos irmãos **Jaide** e **Jairo**.
Agradeço a vocês pelo constante apoio e
incentivo durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Toshie Kawano (*in memoriam*), por ter me recebido no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan. Tua amizade e valiosa orientação me ajudaram muito. Não tenho palavras para te agradecer, mas você sempre estará viva na minha vida profissional. Jamais esquecerei a última coisa que você me disse: "*Josué, fique tranquilo. Eu confio em você*".

À Profa. Dra. Eliana Nakano, pela amizade e orientação. Eu sei que foi muito difícil assumir essa tarefa após a perda da nossa mentora e amiga Toshie.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido ao laboratório.

À todos os estudantes do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho; em especial à Paty Aoki que me ensinou a técnica de perfusão.

Aos funcionários Alex, Arlete, Carlão, Cris, Lurdinha Canaleta e Juruba, pela amizade, convívio e contribuição durante todo o momento que precisei de ajuda. Eu ri muito com vocês. Arlete, perdi as contas dos favores que você me fez; não tenho como te pagar por isso. Alex, você me ajudou muito no microscópio confocal; seu nome sempre constará nos "agradecimentos" dos artigos pelas belas imagens que capturamos. Carlão, você não imagina o quanto foi importante sua contribuição para a manutenção do principal foco desta Tese: o *Schistosoma mansoni*.

Aos pesquisadores Dr. Lincoln Suesdek Rocha e Dra. Maria Carolina Elias, por compartilhar diversos materiais e equipamentos. E aos seus estudantes Fio, Paloma, Mariana, Camila, Dr. Eduardo e Ricardo Peruano, pela amizade e convívio no laboratório.

Aos colegas Dan, Orlando Bloom e Vanessa, pela amizade e convívio durante o período que vocês estavam no laboratório.

Ao Dr. Oswaldo A. Sant`Anna, do Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantan, pelo apoio e orientação antes do credenciamento da Dra. Toshie Kawano.

Aos Profs. Drs. Pedro Ismael S. Júnior, Marisa Rangel e Dominique Corinne H. Fischer, pelas sugestões durante o Exame de Qualificação.

Ao Dr. Ronaldo Z. Mendonça, por gentilmente ter cedido as células utilizadas neste trabalho e pela contribuição nos ensaios de citotoxicidade.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorque Kato e à Dra. Lydia F. Yamagushi do Laboratório de Química de Produtos Naturais (IQ-USP), pelos extratos e compostos utilizados neste trabalho.

Ao Prof. Dr. José Roberto S. A. Leite e toda sua equipe que faz parte do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC-UFPI), especialmente à doutoranda Leiz Veras Miura e ao David Lima da indústria Vegeflora, pela valiosa colaboração.

Ao Dr. Alan Wilson (University of York, York, Inglaterra), pelas discussões sobre a metodologia dos ensaios e pelas fascinantes explicações sobre a biologia de *S. mansoni*.

À Dra. Jennifer Keiser (Swiss Tropical Institute, Basel, Suíça), pelas valiosas sugestões que serviram para melhorar meus artigos.

Ao Dr. Kendi Okuda (Department of Medicine, University of Massachusetts Medical School, EUA), pela discussão dos meus resultados, além do inestimável auxílio com a língua inglesa.

À profa. Dra. Silmara Marques Allegretti, pelas discussões em algumas partes da metodologia deste trabalho.

Aos revisores (anônimos) que avaliaram os meus artigos submetidos. Aprendi muito como autor correspondente.

À Dra. Luciana C. C. Leite e aos colegas Henrique, Léo, Omar e Alex do Laboratório de Biotecnologia Molecular IV (Instituto Butantan), por compartilhar materiais e equipamentos, além das discussões sobre a biologia do *S. mansoni*.

Aos colegas de trabalho na Supervisão de Vigilância em Saúde (SUVIS Casa Verde), especialmente a Karla, Marcos Bolota, Marcelo, Sérgio, Nice, Wagner e Angélica que entenderam minhas ausências.

Às Faculdades Integradas Torricelli (FIT), pelo incentivo e liberação para que eu participasse de diversos eventos científicos. Nesta instituição, conheci muitos professores que hoje são grandes amigos.

Aos estudantes que orientei em Trabalho de Conclusão de Curso ou Iniciação Científica. Aprendi muito com vocês. Nossas pesquisas já resultaram, até o momento, em 3 artigos.

Aos amigos que cresci e convive, pela amizade e incentivo. Um agradecimento especial ao Dimas, pela ajuda na impressão deste trabalho e reprodução de inúmeras cópias de artigos científicos.

Aos parentes das famílias Moraes e Correia que acreditaram no meu trabalho, pelo incentivo.

A toda minha bela família: aos meus pais Oscar e Dulce, aos meus irmãos Jaide e Jairo e ao irmão Jaime (*in memoriam*), que eu não conheci, mas nunca esqueci seu nome. A família aumentou e, portanto, não posso deixar de citar o cunhado Rubens, a cunhada Néia e a minha belíssima sobrinha (e futura farmacêutica) Tamíris. Vocês sempre me incentivaram.

Finalmente, à Aline por todo carinho e compreensão; por sempre ter acompanhado e respeitado minhas decisões e minha ausência. Você será uma excelente farmacêutica e certamente aproveitarei seu potencial.

“Mais do que máquinas, precisamos de humanidade. Mais do que inteligência, precisamos de afeição e doçura. Sem essas virtudes, a vida será de violência e tudo será perdido.”

Charles Chaplin

“A melhor maneira que o homem dispõe para se aperfeiçoar, é aproximar-se de Deus.”

Pitágoras

RESUMO

MORAES, J. **Efeito in vitro de extratos e compostos naturais em *Schistosoma mansoni***. 2011. 236 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

A esquistossomose é uma doença parasitária de grande impacto social, sendo considerada um importante problema de saúde pública em mais de 70 países. Atualmente, o tratamento quimioterápico dessa parasitose é baseado no uso de apenas um fármaco, praziquantel, mas seu uso extensivo e inapropriado culminou no aparecimento de resistência. Dessa forma, é premente a necessidade de novas alternativas terapêuticas, especialmente com o uso de produtos naturais. No presente estudo, avaliou-se o efeito in vitro de 4 compostos isolados de espécies vegetais, as amidas piplartina e piperina, a lignana grandisina e o alcaloide epiisopiloturina; 1 composto isolado da pele de anfíbio, o peptídeo antimicrobiano dermaseptina 01; e de 6 extratos etanólicos obtidos de vegetais, *Piper tuberculatum*, *P. crassinervium*, *P. diospyrifolium*, *P. fuliginum*, *P. gaudichaudianum* e *Pothomorphe umbellata* em adultos (machos e fêmeas com 49 dias) e esquistossômulos (recém-transformados, 1, 3, 5 e 7 dias) de *Schistosoma mansoni* linhagem BH. O estudo in vitro, em vermes adultos e esquistossômulos, da atividade dos compostos e extratos avaliou: 1) a viabilidade de vermes adultos; 2) a capacidade reprodutiva, avaliada pelo acasalamento e oviposição; 3) o efeito no tegumento em parasitas adultos; 4) a viabilidade e o efeito no tegumento em esquistossômulos. Além disso, a citotoxicidade de compostos e extratos em células de mamífero (célula Vero) também foi avaliada. Os resultados deste estudo mostraram que os compostos e extratos reduziram a motilidade e causaram a morte dos parasitas com alterações morfológicas no tegumento, cujos efeitos foram diretamente dependentes da concentração, do tempo de incubação e da idade dos helmintos. Nas concentrações subletais notou-se, ainda, redução na oviposição. Os ensaios in vitro revelaram que todos os compostos e extratos apresentaram ação letal aos esquistossomos sem afetar a viabilidade das células de mamífero. No geral, os esquistossômulos e adultos de *S. mansoni* foram mais susceptíveis a piplartina, dermaseptina e a todos os extratos etanólicos. Pela contagem dos tubérculos em uma área da região dorsal dos helmintos machos, usando microscopia confocal, neste estudo também é apresentado um novo modelo experimental que avalia, quantitativamente, o efeito de compostos e/ou extratos no tegumento dos esquistossomos.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. Esquistossomose. Atividade esquistossomicida. Anti-helmíntico. In vitro. Composto e extrato de plantas.

ABSTRACT

MORAES, J. **In vitro effect of extracts and natural compounds on *Schistosoma mansoni***. 2011. 236 p. Ph. D. Thesis (Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Schistosomiasis is a parasitic disease of great social impact, and it is considered an important public health problem in over 70 countries. Currently, chemotherapy treatment for this disease is based on only one drug, praziquantel, but its extensive and inappropriate use culminated the emergence of resistance. Thus, there is a need to develop new antischistosomal compounds, particularly with the use of natural products. In this study, the in vitro effect of 4 compounds isolated from plant species, amides piplartine and piperine, the lignin grandisin and alkaloid epiisopiloturine; 1 compound isolated from amphibian skin, the antimicrobial peptide dermaseptin 01; and 6 ethanolic extracts of plants, *Piper tuberculatum*, *P. crassinervium*, *P. diospyrifolium*, *P. fuligineum*, *P. gaudichaudianum* and *Pothomorphe umbellata* was evaluated in adults worm pairs (49-day-old) and schistosomula (newly-transformed, 1-, 3-, 5-, and 7-day-old) of *Schistosoma mansoni* BH strain. The effect of compounds and extracts against schistosomes was examined regarding: 1) adult worms survival, 2) the reproductive fitness as assessed by mating and oviposition; 3) alterations on adult worms tegumental surface, and 4) viability and morphological alterations on schistosomula. Furthermore, the cytotoxicity of compounds and extracts in mammalian cells (Vero cells) was also evaluated. Results show that all compounds and extracts reduced the motor activity of worms, caused their death, and induced morphological changes on the tegument. All these effects were dependent on concentration, incubation time and age of helminths. At sublethal concentrations, extracts and compounds inhibited egg laying. The cytotoxicity was not detected in Vero cells after treatment with natural products. In general, adults and schistosomula of *S. mansoni* were more susceptible to piplartine, dermaseptin and all the ethanolic extracts. Morphological alterations on male worms were performed using confocal microscopy analysis by counting of the numbers of tubercles. In addition, this study shows a new experimental model to evaluate quantitatively the effect of compounds and/or extracts on the tegument of the schistosomes.

Key words: *Schistosoma mansoni*. Schistosomiasis. Schistosomicidal activity. Anti-helminthic. In vitro. Compound and plant extracts.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AFA – solução contendo ácido acético, formaldeído e álcool
- ATCC – “American Type Culture Collection”
- CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica, Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo
- DMSO – dimetilsulfóxido
- DMEM – meio de cultivo, Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
- DS – dermaseptina
- HEPES – tampão [ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanossulfônico)]
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PZQ – praziquantel
- RPMI 1640 – meio de cultivo “Roswell Memorial Park Institute”

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribuição global da esquistossomose	29
Figura 2.	Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil, de acordo com o nível de prevalência dos municípios	30
Figura 3.	Ciclo de vida do <i>Schistosoma mansoni</i>	32
Figura 4.	Área comumente associada à transmissão da esquistossomose	34
Figura 5.	Estrutura química das moléculas e sequência primária do peptídeo antimicrobiano dermaseptina	49
Figura 6.	Região dorsal de um macho de <i>Schistosoma mansoni</i>, onde é avaliado, quantitativamente, o efeito de compostos e extratos sobre o tegumento	55
Figura 7.	Efeito da amida piplartina na sobrevivência de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	61
Figura 8.	Efeito do peptídeo dermaseptina na sobrevivência de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	62
Figura 9.	Efeito do alcaloide epiisopiloturina na sobrevivência de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	63
Figura 10.	Efeito da amida piperina na sobrevivência de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	64
Figura 11.	Efeito da lignana grandisina na sobrevivência de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	65
Figura 12.	Efeito do extrato de <i>Piper tuberculatum</i> na sobrevivência de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	66
Figura 13.	Efeito do extrato de <i>Piper crassinervium</i> na sobrevivência de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	67
Figura 14.	Efeito do extrato de <i>Piper diospyrifolium</i> na sobrevivência de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	68
Figura 15.	Efeito do extrato de <i>Piper fuligineum</i> na sobrevivência de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	69
Figura 16.	Efeito do extrato de <i>Piper gaudichaudianum</i> na sobrevivência de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	70
Figura 17.	Efeito do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> na sobrevivência de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	71
Figura 18.	Efeito da amida piplartina no tegumento de macho de <i>Schistosoma mansoni</i>	102
Figura 19.	Efeito do peptídeo dermaseptina 01 no tegumento de macho de <i>Schistosoma mansoni</i>	103
Figura 20.	Efeito do alcaloide epiisopiloturina no tegumento de macho de <i>Schistosoma mansoni</i>	104
Figura 21.	Efeito da amida piperina no tegumento de macho de <i>Schistosoma mansoni</i>	105

Figura 22.	Efeito da lignana grandisina no tegumento de macho de <i>Schistosoma mansoni</i>	106
Figura 23.	Efeito do extrato de <i>Piper tuberculatum</i> no tegumento de machos de <i>Schistosoma mansoni</i>	106
Figura 24.	Efeito do extrato de <i>Piper crassinervium</i> no tegumento de machos de <i>Schistosoma mansoni</i>	107
Figura 25.	Efeito do extrato de <i>Piper diospyrifolium</i> no tegumento de machos de <i>Schistosoma mansoni</i>	107
Figura 26.	Efeito do extrato de <i>Piper fuliginum</i> no tegumento de machos de <i>Schistosoma mansoni</i>	108
Figura 27.	Efeito do extrato de <i>Piper gaudichaudianum</i> no tegumento de machos de <i>Schistosoma mansoni</i>	108
Figura 28.	Efeito do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> no tegumento de machos de <i>Schistosoma mansoni</i>	109
Figura 29.	Efeito da amida piplartina nas ventosas de machos de <i>Schistosoma mansoni</i>	110
Figura 30.	Efeito de compostos nos tubérculos de machos de <i>Schistosoma mansoni</i> .	112
Figura 31.	Efeito de extratos vegetais nos tubérculos de machos de <i>Schistosoma mansoni</i>	113
Figura 32.	Efeito de compostos na oviposição de <i>Schistosoma mansoni</i>	117
Figura 33.	Efeito de extratos de plantas na oviposição de <i>Schistosoma mansoni</i>	118
Figura 34.	Efeito da piplartina, dermaseptina 01 e piperina nos esquistossômulos, recém transformados e sete dias de idade, de <i>Schistosoma mansoni</i>	146
Figura 35.	Efeito da epiisopiloturina e grandisina nos esquistossômulos, recém-transformados e sete dias de idade, de <i>Schistosoma mansoni</i>	147
Figura 36.	Efeito dos extratos de <i>Piper tuberculatum</i>, <i>Piper crassinervium</i> e <i>Piper diospyrifolium</i> nos esquistossômulos, recém-transformados e sete dias de idade, de <i>Schistosoma mansoni</i>	148
Figura 37.	Efeito dos extratos de <i>Piper tuberculatum</i>, <i>Piper crassinervium</i> e <i>Piper diospyrifolium</i> nos esquistossômulos, recém-transformados e sete dias de idade, de <i>Schistosoma mansoni</i>	149
Figura 38.	Viabilidade da célula Vero em presença de praziquantel e piplartina	153
Figura 39.	Viabilidade da célula Vero em presença de dermaseptina 01 e epiisopiloturina	154
Figura 40.	Viabilidade da célula Vero em presença de piperina e grandisina	155
Figura 41.	Viabilidade da célula Vero em presença de extratos de <i>Piper tuberculatum</i> e <i>Piper crassinervium</i>	156
Figura 42.	Viabilidade da célula Vero em presença de extratos de <i>Piper diospyrifolium</i> e <i>Piper fuliginum</i>	157
Figura 43.	Viabilidade da célula Vero em presença de extratos de <i>Piper gaudichaudianum</i> e <i>Pothomorphe umbellata</i>	158

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Compostos com características esquistossomicidas usados na terapêutica experimental ou clínica da esquistossomose	39
Tabela 2 -	Extratos ou compostos naturais com efeito esquistossomicida, in vitro, em <i>Schistosoma mansoni</i>	40
Tabela 3 -	Grupo químico e origem dos compostos selecionados para verificar o efeito in vitro em adultos e esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>	47
Tabela 4 -	Espécies vegetais e origem dos extratos selecionados para verificar o efeito in vitro em adultos e esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>	48
Tabela 5 -	Composição do meio 169	53
Tabela 6 -	Concentração mínima de compostos e extratos capaz de causar efeito esquistossomicida em 100% dos adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	73
Tabela 7 -	Efeito da amida piplartina na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	75
Tabela 8 -	Efeito do peptídeo dermaseptina na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	76
Tabela 9 -	Efeito do alcaloide epiisopiloturina na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	77
Tabela 10 -	Efeito da amida piperina na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	78
Tabela 11 -	Efeito da lignana grandisina na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	79
Tabela 12 -	Efeito do extrato de <i>Piper tuberculatum</i> na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	80
Tabela 13 -	Efeito do extrato de <i>Piper crassinervium</i> na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	81
Tabela 14 -	Efeito do extrato de <i>Piper diospyrifolium</i> na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	82
Tabela 15 -	Efeito do extrato de <i>Piper fuliginum</i> na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	83
Tabela 16 -	Efeito do extrato de <i>Piper gaudichaudianum</i> na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	84
Tabela 17 -	Efeito do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i> na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	85
Tabela 18 -	Alterações tegumentares em adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante incubação com a amida piplartina	90
Tabela 19 -	Alterações tegumentares em adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante incubação com o peptídeo dermaseptina 01	91
Tabela 20 -	Alterações tegumentares em adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante incubação com o alcaloide epiisopiloturina	92

Tabela 21 -	Alterações tegumentares em adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante incubação com a amida piperina	93
Tabela 22 -	Alterações tegumentares em adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante incubação com a lignana grandisina	94
Tabela 23 -	Alterações tegumentares em adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante incubação com o extrato de <i>Piper tuberberculatum</i>	95
Tabela 24 -	Alterações tegumentares em adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante incubação com o extrato de <i>Piper crassinervium</i>	96
Tabela 25 -	Alterações tegumentares em adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante incubação com o extrato de <i>Piper diospyrifolium</i>	97
Tabela 26 -	Alterações tegumentares em adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante incubação com o extrato de <i>Piper fuligineum</i>	98
Tabela 27 -	Alterações tegumentares em adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante incubação com o extrato de <i>Piper gaudichaudianum</i>	99
Tabela 28 -	Alterações tegumentares em adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante incubação com o extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i>	100
Tabela 29 -	Redução do número de ovos de <i>Schistosoma mansoni</i> durante incubação com compostos e extratos vegetais	120
Tabela 30 -	Viabilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>, com diferentes idades, em presença de praziquantel	125
Tabela 31 -	Viabilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>, com diferentes idades, em presença da amida piplartina	127
Tabela 32 -	Viabilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>, com diferentes idades, em presença do peptídeo dermaseptina 01	128
Tabela 33 -	Viabilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>, com diferentes idades, em presença de epiisopiloturina	129
Tabela 34 -	Viabilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>, com diferentes idades, em presença da amida piperina	130
Tabela 35 -	Viabilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>, com diferentes idades, em presença da lignana grandisina	131
Tabela 36 -	Viabilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>, com diferentes idades, em presença do extrato de <i>Piper tuberculatum</i>	132
Tabela 37 -	Viabilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>, com diferentes idades, em presença do extrato de <i>Piper crassinervium</i>	133
Tabela 38 -	Viabilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>, com diferentes idades, em presença do extrato de <i>Piper diospyrifolium</i>	134
Tabela 39 -	Viabilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>, com diferentes idades, em presença do extrato de <i>Piper fuligineum</i>	135
Tabela 40 -	Viabilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>, com diferentes idades, em presença do extrato de <i>Piper gaudichaudianum</i> .	136
Tabela 41 -	Viabilidade de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>, com diferentes idades, em presença do extrato de <i>Pothomorphe umbellata</i>	137

Tabela 42 -	Concentração mínima de compostos e extratos capaz de causar efeito esquistossomicida em 100% dos esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>	141
Tabela 43 -	Concentração mínima de compostos e extratos capaz de causar efeito esquistossomicida em todos os esquistossômulos (recém-transformados e 7 dias de idade) e adultos (machos e fêmeas, com 49 dias) de <i>Schistosoma mansoni</i>	144

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 <i>Schistosoma mansoni</i> e a esquistossomose	27
2.2 Controle da esquistossomose mansônica	33
3 OBJETIVOS	42
3.1 Geral	43
3.2 Específico	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1 Animais utilizados e manutenção do ciclo evolutivo de <i>Schistosoma mansoni</i>	45
4.1.1 <i>Linhagem do Schistosoma mansoni</i>	45
4.1.2 <i>Animais hospedeiros</i>	45
4.1.3 <i>Manutenção do ciclo evolutivo de Schistosoma mansoni</i>	45
4.2 Compostos e extratos vegetais	46
4.3 Preparo das amostras	50
4.4 Recuperação dos vermes adultos e ensaios in vitro	50
4.4.1 <i>Recuperação dos vermes adultos</i>	50
4.4.2 <i>Ensaio in vitro com vermes adultos</i>	51
4.5 Obtenção de esquistossômulos de diferentes idades e ensaios in vitro .	51
4.5.1 <i>Obtenção de esquistossômulos</i>	51
4.5.2 <i>Ensaio in vitro com esquistossômulos</i>	52
4.6 Avaliação da atividade de compostos e extratos em adultos e esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>	53
4.6.1 <i>Avaliação da atividade de compostos e extratos em vermes adultos</i> ..	53
4.6.2 <i>Avaliação da atividade de compostos e extratos em esquistossômulos</i>	54

4.7 Análise morfológica no tegumento de adultos e esquistossômulos com microscopia confocal	54
4.8 Cultura de células e ensaios de citotoxicidade	55
4.8.1 Linhagem celular e condições de cultivo	55
4.8.2 Ensaios de citotoxicidade	56
4.9 Análises gráficas e estatísticas	57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
5.1 Viabilidade de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em presença de compostos e extratos	59
5.1.1 Alterações na viabilidade de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em presença de compostos e extratos	60
5.1.2 Efeito de compostos e extratos na atividade motora e no acasalamento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	74
5.2 Efeito de compostos e extratos no tegumento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	88
5.2.1 Alterações no tegumento de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i> em presença de compostos e extratos	89
5.3 Efeito de compostos e extratos na oviposição de <i>Schistosoma mansoni</i>	115
5.3.1 Efeito de compostos e extratos, em concentrações subletais, na oviposição de adultos de <i>Schistosoma mansoni</i>	116
5.4 Alterações na viabilidade e no tegumento de esquistossômulos de <i>Schistosoma mansoni</i>, com diferentes idades, em presença de compostos e extratos	122
5.4.1 Alterações na viabilidade de esquistossômulos, com diferentes idades, em presença de compostos e extratos	123
5.4.2 Alterações no tegumento de esquistossômulos, com diferentes idades, em presença de compostos e extratos	145
5.5 Toxicidade de compostos e extratos em células de mamífero	151
5.5.1 Atividade citotóxica de compostos e extratos vegetais em células Vero	152
5.6 Considerações finais	160
6 CONCLUSÃO	164

REFERÊNCIAS	166
ANEXOS	186
ANEXO A - <i>Schistosoma mansoni</i>: In vitro schistosomicidal activity of piplartine	187
ANEXO B - Evaluation of the in vitro activity of dermaseptin 01, cationic antimicrobial peptide, against <i>Schistosoma mansoni</i>	195
ANEXO C - Evaluation of the in vitro activity of epiisopiloturin alkaloid isolated from jaborandi (<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Holm.; Rutaceae) against <i>Schistosoma mansoni</i> and <i>Leishmania amazonensis</i>	207

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária de grande impacto social, sendo considerada um importante problema de saúde pública em vários países. É causada pelo trematódeo digenético do gênero *Schistosoma* e apresenta formas agudas ou crônicas, com sintomatologia variada (FENWICK e WEBSTER, 2006; GRYSEELS et al., 2006).

Enquanto a maioria das parasitoses humanas vai diminuindo de importância, em função do desenvolvimento econômico e dos métodos de controle disponíveis, a esquistossomose encontra-se ainda em expansão, em muitas regiões do mundo, sendo endêmica em mais de 70 países. Estima-se a existência, em todo mundo, de mais de 200 milhões de indivíduos infectados e 800 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair infecção. Esta helmintose é responsável por 280.000 a 500.000 mortes anualmente (DUPRÉ et al., 1999; STEINMANN et al., 2006). No Brasil, onde o *Schistosoma mansoni* é prevalente, a esquistossomose é endêmica em 19 estados. Acredita-se haver, no território nacional, entre 6 e 8 milhões de indivíduos infectados e 26 milhões correm o risco de infecção (AMARAL et al., 2006). De acordo com a Portaria Nº 104, de 25 de janeiro de 2011 do Ministério da Saúde (MS), a esquistossomose faz parte da Lista de Notificação Compulsória (LCN), e a doença deverá ser registrada em áreas endêmicas e não endêmicas. Entretanto, os casos ainda são subnotificados (BRASIL, 2006, 2011).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu a esquistossomose na sua lista de doenças negligenciadas e esta verminose continua sendo uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo. A esquistossomose incapacita ou mata milhares de pessoas e representa uma necessidade médica importante que permanece não atendida. Embora as doenças negligenciadas sejam responsáveis por 11,4% da carga global de doenças, apenas 21 (1,3%) dos 1.556 novos medicamentos registrados entre 1975 e 2004 foram desenvolvidos especificamente para essas doenças. Durante o mesmo período, 1.535 medicamentos foram registrados para outras doenças (CHIRAC e TORREELE, 2006; HOTEZ et al., 2007).

Atualmente o tratamento quimioterápico da esquistossomose é baseado no uso de apenas um fármaco, praziquantel, mas seu uso extensivo e inapropriado culminou o aparecimento de resistência (CAFFREY, 2007; DOENHOFF et al., 2008). Além disso, o fármaco é eficaz somente contra as formas adultas do esquistossomo, não atuando, portanto, nas formas jovens do parasita, os esquistossômulos (SABAH et al., 1986; UTZINGER et al., 2003). Dessa forma, é premente a necessidade de novas alternativas terapêuticas, especialmente com o uso de produtos naturais (NDAMBA et al., 1994; MØLGAARD et al., 2001; SANDERSON; BARTLETT; WHITFIELD, 2002; MOHAMED; METWALLY; MAHMOUD, 2005).

No presente estudo avaliou-se o efeito *in vitro* de 4 compostos isolados de espécies vegetais, as amidas piplartina e piperina, a lignana grandisina e o alcaloide

epiisopiloturina; 1 composto isolado da pele de anfíbio, o peptídeo antimicrobiano dermaseptina 01; e de 6 extratos etanólicos obtidos de vegetais, *Piper tuberculatum*, *P. crassinervium*, *P. diospyrifolium*, *P. fuliginum*, *P. gaudichaudianum* e *Pothomorphe umbellata* em adultos (machos e fêmeas com 49 dias) e esquistossômulos (recém-transformados, 1, 3, 5 e 7 dias) de *Schistosoma mansoni* linhagem BH.

Os compostos e extratos vegetais supracitados foram utilizados neste estudo devido alguns aspectos, entre os quais: a) apresentam diversas atividades biológicas conhecidas; b) as plantas são de fácil propagação e ciclo reprodutivo curto; c) as espécies apresentam ampla distribuição geográfica no território nacional e em diversas regiões do mundo; d) facilidade no isolamento de metabólitos secundários; e) alguns compostos já são sintetizados; f) os vegetais são comumente usados na medicina popular (PALMAR et al., 1997; PINHEIRO et al., 1997; JARAMILLO e MANOS, 2001; SANTOS e MORENO, 2004; PRASAD et al., 2005; KATO e FURLAN, 2007).

A piplartina {5,6-dihydro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-trans-2-propenyl]-2(1H)pyridinone} é uma amida encontrada em espécies do gênero *Piper* (PARMAR et al., 1997). Na sua forma pura, a piplartina é obtida com rendimento na faixa de 1% (BRAZ-FILHO et al., 1981; BEZERRA et al., 2006; CÍCERO BEZERRA FELIPE et al., 2007). Esta substância apresenta diversas atividades biológicas avaliadas in vitro ou in vivo, tais como efeito ansiolítico e antidepressivo, anti-inflamatório, antiplaquetário e antitumoral (BEZERRA et al., 2005; 2006, 2008; CÍCERO BEZERRA FELIPE et al., 2007; FONTENELE et al., 2009). A piplartina possui efeito inseticida para formigas e lagartas, bem como atividade antifúngica em *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioedes* (CAPRON e WIEMER, 1996; NAVICKIENE et al., 2000, 2003; VASQUES DA SILVA et al., 2002). Além disso, o efeito antiparasitário in vitro da piplartina foi descrito em promastigota de *Leishmania donovani* e epimastigota de *Trypanosoma cruzi* (BODIWALA et al., 2007; COTINGUIBA et al., 2009).

A piperina {1-[5-(1,3)-benzodioxol-5-yl]-1-oxo-2,4-pentadienyl}piperidine} é uma amida encontrada nas espécies do gênero *Piper*, sendo o principal metabólito presente em *Piper nigrum* (pimenta do reino). A piperina é abundante principalmente nos frutos e foi a primeira amida a ser isolada das espécies de *Piper*. Na sua forma pura, a piperina é obtida com rendimento de 5% a 7%. A piperina é a responsável pela sensação picante das pimentas, cujo consumo é apreciável em diversas regiões do mundo (PARMAR et al., 1997; CARDOSO et al., 2005). Apresenta diversas atividades biológicas, tais como ação antipirética, antioxidante, antitumoral, analgésica e anti-inflamatória (PARMAR et al., 1997; BEZERRA et al., 2005, 2006, 2008). A piperina também possui ação inseticida em formigas, baratas, besouros, traças, pulgões, lagartas, bem como em larvas de *Musca domestica*, *Culex quinquefasciatus* e *Aedes aegypti* (DAS et al., 1996; AHN et al., 1998; ESTRELA et al., 2003; SIMAS et al., 2007). A ação letal de piperina

também foi relatada em ácaros, fungos e bactérias (AHN et al., 1998; VASQUES DA SILVA et al., 2002; KUMAR et al., 2008; SHARMA et al., 2010). Além disso, o efeito antiparasitário da piperina foi descrito in vitro em epimastigota e amastigota de *Trypanosoma cruzi* e in vivo em camundongos e hamsters infectados com *Leishmania donovani* (RAAY et al., 1999; RIBEIRO et al., 2004; VEERAREDDY; VOBALABOINA; NAHID, 2004; FREIRE-DE-LIMA et al., 2008).

A grandisina {(2*S*,3*S*,4*S*,5*S*)-3,4-dimethyl-2,5-bis(3,4,5 trimethoxyphenyl) oxolane} é uma lignana encontrada em diversas espécies de plantas como *Piper solmsianum* (Piperaceae), *Virola surinamensis* (Myristicaceae), *Rhaphidophora decursiva* (Araceae), *Aristolochia birostris* (Aristolochiaceae), *Aglaia leptantha* (Meliaceae), *Cryptocarya crassinervia* e *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) (SAAD et al., 1991; ZHANG et al., 2001; FRANÇA et al., 2005; da SILVA FILHO, 2008; CARVALHO et al., 2010). Este composto possui efeito larvicida em *Aedes aegypti* e ação ovicida e larvicida em mosca varejeira *Chrysomya megacephala* (CABRAL et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2009). Além disso, a grandisina apresenta efeito antiparasitário in vitro em tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* (LOPES et al., 1998; MARTINS et al., 2000, 2003).

A epiisopiloturina {2(3H)-furanone,dihydro-3-[(*S*)-hydroxyphenylmethyl]-4-[(1-methyl-1H-imidazol-4-yl)methyl]-,(3*S*,4*R*)-} é um alcaloide imidazólico encontrado em folhas de plantas do gênero *Pilocarpus*, popularmente conhecidas como jaborandi. É o segundo composto mais abundante nas folhas do jaborandi, depois da pilocarpina (ANDRADE-NETO, 1994; SANTOS e MORENO, 2004). Segundo David Lima, 2010 (comunicação pessoal; Vegeflora Extrações do Nordeste LTDA, Parnaíba, PI) o rendimento da epiisopiloturina é próximo de 1%. Os efeitos biológicos da epiisopiloturina ainda são pouco conhecidos. Sua atividade antibacteriana foi avaliada in vitro em diversas linhagens de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* e não apresentou ação inibitória; e também não possuiu efeito antiviral quando testado em Dengue Virus (MIURA, 2009). Por outro lado, Miura et al., 2010 (prelo) mostraram que a epiisopiloturina possui ação antiparasitária em amastigota de *Leishmania amazonensis*.

As dermaseptinas representam uma família de peptídeos antimicrobianos catiônicos, de 24 a 34 resíduos de aminoácidos, encontrados na pele de anfíbios do gênero *Phyllomedusa* (MOR; HANI; NICOLAS, 1994; BRAND et al., 2002, 2006; LEQUIN et al., 2006). Estes peptídeos exercem atividade biocida em bactérias gram-positivas e gram-negativas, fungos filamentosos e leveduras, bem como apresentam efeito antiviral (FLEURY et al., 1998; BRAND et al., 2002; CHINCHAR et al., 2004; LORIN et al., 2005; LEITE et al., 2008). Além disso, o efeito antiparasitário das dermaseptinas foi descrito in vitro em tripomastigota e epimastigota de *Trypanosoma cruzi*, em promastigota de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi* e também na fase eritrocitária de *Plasmodium falciparum* (BRAND et al., 2002, 2006; DAGAN et al., 2002; ZAMPA et al., 2009). Em

particular, a dermaseptina 01 é um peptídeo com 29 resíduos de aminoácidos que foi isolado da secreção cutânea de *Phyllomedusa oreades*, um pequeno anfíbio encontrado no Cerrado Brasileiro (BRAND et al., 2002). Estas moléculas antimicrobianas também exercem atividade contra bactérias, fungos e protozoários parasitas como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* (BRAND et al., 2002; LEITE et al., 2008; ZAMPA et al., 2009).

Plantas da família Piperaceae são muito conhecidas pela sua utilização como terapêuticos na medicina popular e por apresentar, em sua composição, diversas substâncias com propriedades biocidas (PARMAR et al., 1997; PRASAD et al., 2005). Os vegetais são usados na medicina alternativa contra febre, dores e inflamações em geral, antídotos no caso de acidentes com animais peçonhentos, além de aplicado contra reumatismo, asma, bronquite, hemorróidas, doenças gastrointestinais, respiratórias, cardiovasculares, renais. As espécies de Piperaceae também são usadas no tratamento de pele, com características fotoprotetoras e antitumorais, assim como são desintoxicantes para o organismo, melhora a imunidade e são utilizadas para emagrecimento (PARMAR et al., 1997; PRASAD et al., 2005). Extratos e compostos isolados de diferentes partes de Piperaceae (raiz, caule, folha, flor fruto e semente) foram avaliados quanto ao efeito biológico em diversos organismos. *Piper tuberculatum*, *P. crassinervium* e *P. gaudichaudianum* apresentam efeito fungicida (LAGO et al., 2004; MORANDIM et al., 2010). *Piper tuberculatum* também possui efeito inseticida em lagartas, besouros e larvas de *Aedes atropalpus* (SCOTT et al., 2002, 2004; REGASINI et al., 2009). *Piper diospyrifolium* e *P. crassinervium* apresentam atividade moluscicida em *Biomphalaria tenagophila* (RAPADO et al., 2010). *Pothomorphe umbellata* possui ação antibacteriana em *Helicobacter pylori* e também é utilizado como antimalárico na medicina popular (DE FERREIRA-DA-CRUZ et al., 2000; ISOBE et al., 2002). Além disso, *P. tuberculatum*, *P. crassinervium* e *P. gaudichaudianum* são tóxicos em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (BATISTA et al., 2008; REGASINI et al., 2009). O valor nutricional de diversas espécies de Piperaceae é relativamente alto, por constituir boas fontes de vitaminas, e apresenta, ainda, caroteno, fibras cálcio, ferro, entre outros (PARMAR et al., 1997; PRASAD et al., 2005)

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Schistosoma mansoni* e a esquistossomose

Helmintos do gênero *Schistosoma* pertencem ao filo Platyhelminthes, classe Trematoda e subclasse Digenea. Os trematódeos digenéticos são organismos inteiramente adaptados ao parasitismo, com um ciclo biológico complexo que envolve hospedeiros intermediários e definitivos. São achatados dorsoventralmente, de simetria bilateral, sem segmentação, tendo o tegumento coberto por uma citomembrana de aspecto sincicial. Os órgãos de fixação são constituídos por duas ventosas: a mais anterior, oral, onde se encontra a abertura bucal, e a ventral ou acetábulo. O sistema digestivo termina em um fundo cego, isto é, sem ânus (SCHELL, 1970). Muitas espécies de trematódeos afetam a população humana em regiões tropicais e subtropicais do mundo, particularmente nas áreas menos desenvolvidas. As esquistossomoses estão entre as doenças de mais alta endemicidade no planeta; elas são devidas a helmintos trematódeos do gênero *Schistosoma* (CHITSULO et al., 2000; STEINMANN et al., 2006).

As espécies de *Schistosoma* pertencem à família Schistosomatidae, que se caracteriza por apresentar sexos separados e acentuado dimorfismo sexual. Essa família possui parasitas que, em sua fase adulta, vivem nos vasos sanguíneos de mamíferos, aves e alguns répteis. Os parasitas do homem são todos do gênero *Schistosoma*, que determinam a doença denominada esquistossomose (CHITSULO et al., 2000; BROOKER; CLEMENTS; BUNDY, 2006; GRYSEELS et al., 2006; STEINMANN et al., 2006).

O *Schistosoma mansoni* adulto é tipicamente um helminto delgado e longo. O macho mede cerca de 1 cm de comprimento, formando um sulco longitudinal ou canal ginecóforo; é bem claro, com tegumento recoberto por minúsculos espinhos e tubérculos. A fêmea é mais delgada, medindo cerca de 1,5 cm de comprimento, é mais escura (acinzentada), em decorrência do sangue semidigerido presente no ceco e do pigmento dessa digestão, a homozoína. A topografia da superfície do corpo é bem mais simples que a do macho, com aspecto escavado. A superfície inteira do verme é recoberta por uma camada sincicial denominada de tegumento, o qual é ligado por estreitas conexões citoplasmáticas aos corpos celulares nucleados. As membranas apicais do tegumento, interface de contato entre o parasita e o hospedeiro, são constituídas por sete camadas (heptalaminar), cuja estrutura é formada por duas camadas lipídicas justapostas, constituindo o membranocálix. Essas camadas estão em contínuo processo de renovação, fato importante na capacidade de escape do helminto à resposta imune do hospedeiro (RACE et al., 1971; HOCKLEY, 1973). O acasalamento é fundamental para proteção da fêmea e, principalmente, para maturidade sexual, incluindo-se a produção de ovos, que são os responsáveis pela patologia da esquistossomose (ERASMUS, 1973, 1986; MACHADO-SILVA et al., 2008).

As esquistossomoses, denominadas também esquitossomíases ou bilharzioses, são doenças que, para o homem, têm como os principais agentes etiológicos as espécies *Schistosoma mansoni*, *S. intercalatum*, *S. haematobium*, *S. japonicum* e *S. mekongi* (Figura 1). *Schistosoma mansoni* está presente em mais de 50 países nos continentes africano e americano, onde determina uma infecção denominada esquitossomose mansônica (CHITSULO et al., 2000; BROOKER; CLEMENTS; BUNDY, 2006; GRYSEELS et al., 2006).

No Brasil, a esquistossomose mansônica foi detectada pela primeira vez por Pirajá da Silva em 1907 no estado da Bahia, e ainda hoje é considerado um grande problema de saúde pública (AMARAL et al., 2006). A doença é conhecida popularmente por xistossomose, xistosa, doença dos caramujos ou mal dos caramujos, moléstia de Pirajá da Silva e, também, por "barriga d'água", devido à ascite que acompanha as formas mais graves com fibrose hepática. Atualmente, a esquistossomose mansônica é endêmica em 19 estados e no Distrito Federal (Figura 2). Em decorrência da intensa migração interna, existe uma zona endêmica quase contínua do Ceará ao Espírito Santo, concentrada principalmente na região costeira. Bahia e Minas Gerais são os estados mais endêmicos, com distribuição de casos em quase todo território (KATZ e PEIXOTO, 2000; AMARAL et al., 2006); focos isolados também foram assinalados nos estados do Pará, Goiás e na região Sul do país.

Em São Paulo, existem focos nos Vales do Ribeira, do Paraíba, do Tietê e do Paranapanema; nas Zonas Litorânea e Alta Sorocabana; além dos municípios de São Paulo, São Caetano do Sul, Guarulhos e Campinas (SILVA, 1985; REY, 2008; NEVES, 2005; AMARAL et al., 2006; MORAES, 2009). Segundo o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE) da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, a maior ocorrência da doença é por casos importados, mas 22 municípios ainda registraram casos autóctones. No ano de 2005, por exemplo, foram confirmados 2.352 casos de esquistossomose, dos quais 72,3% eram importados (CVE, 2005).

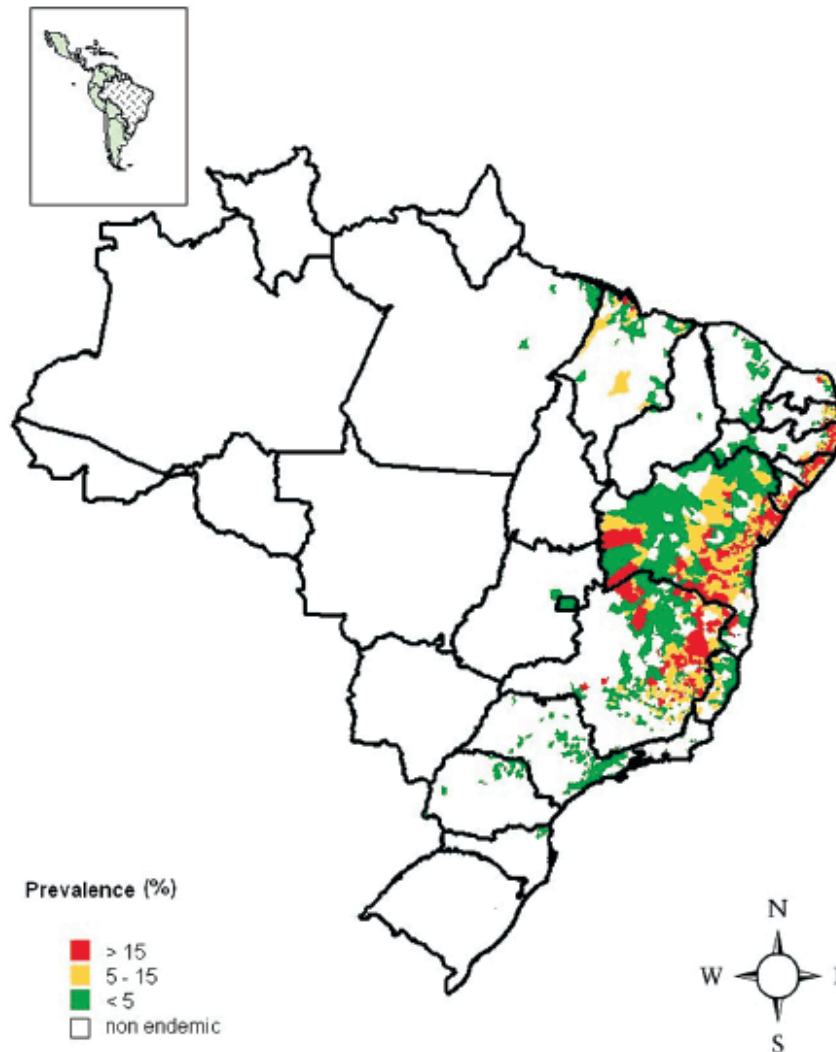


Figura 2. **Distribuição da esquistossomose mansônica no Brasil, de acordo com o nível de prevalência dos municípios.** Distribuição da verminose causada pelo *Schistosoma mansoni*.

Fonte: Amaral et al. (2006).

A esquistossomose mansônica é transmitida por caramujos de água doce, hermafroditas e pertencentes ao gênero *Biomphalaria* da família Planorbidae. Três espécies de *Biomphalaria* são responsáveis pela transmissão da esquistossomose no continente americano: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*. *Biomphalaria glabrata* é o principal vetor da esquistossomose no Brasil e é a espécie mais estudada devido a sua ampla distribuição geográfica e eficiência na suscetibilidade pelo parasita, apresentando altos índices de infecção natural e experimental (MORGAN et al., 2001; PARAENSE, 2001).

Schistosoma mansoni possui uma biologia muito interessante, pois passa por diversas fases e vive em hospedeiros e ambientes diversificados, com uma grande

capacidade de adaptação, multiplicação e resistência. As fases do ciclo biológico do *S. mansoni* compreendem dois períodos de vida parasitária: um no hospedeiro intermediário e outro no hospedeiro definitivo. Entre as fases parasitárias há dois períodos de vida livre em meio aquático: as fases de miracídio e cercária (ROSS et al., 2002; BLANCHARD, 2004; GRYSEELS et al., 2006). *Schistosoma mansoni*, em geral, realizam ciclo assexuado nos moluscos do gênero *Biomphalaria*, enquanto que os espécimes adultos são encontrados nos vasos mesentéricos e no sistema porta de mamíferos das ordens Primates, Rodentia, Artiodactyla e Carnivora. O ciclo de vida do *S. mansoni* está representado na Figura 3.

Os vermes adultos de *S. mansoni* alojam-se aos pares em vênulas terminais do plexo mesentérico inferior que drenam a parede intestinal. A cada dia, cerca de 300 ovos medindo 110-180 µm por 45-70 µm, são eliminados pela fêmea no interior das vênulas. Com base em modelos experimentais, estima-se que entre a metade e um terço desses ovos chegam ao meio externo através das fezes. A inflamação que a presença dos ovos desperta no hospedeiro pode resultar em ruptura da parede da vênula, liberando os ovos nos tecidos perivasculares e, finalmente, na luz intestinal. Cinco anos é a vida média do *S. mansoni*, embora alguns casais possam viver mais de 30 anos eliminando ovos (ROSS et al., 2002; GRYSEELS et al., 2006).

Quando as fezes contendo ovos do parasita entram em contato com a água, os ovos se rompem e liberam os miracídios, forma larvária do helminto que penetra no caramujo. No interior dos moluscos os parasitas se multiplicam dando origem às cercárias, que são liberadas na água após cerca de 30 dias. Penetrando através da pele, a cercária perde a cauda transformando-se em esquistossômulo. Ganhando acesso aos vasos e à circulação sistêmica, os parasitas jovens migram através dos pulmões e do fígado. Cerca de 5 semanas após a infecção, já estando alojados nas veias mesentéricas, os vermes atingem a maturidade sexual e tem início a postura de ovos, de modo que eles aparecem nas fezes cerca de 40 dias após a penetração das cercárias. Dessa forma, no hospedeiro vertebrado, o parasita passa de cercária para esquistossômulo de pele, esquistossômulo pulmonar, verme imaturo (adulto jovem) e verme adulto macho ou fêmea (ROSS et al., 2002; BLANCHARD, 2004; GRYSEELS et al., 2006).

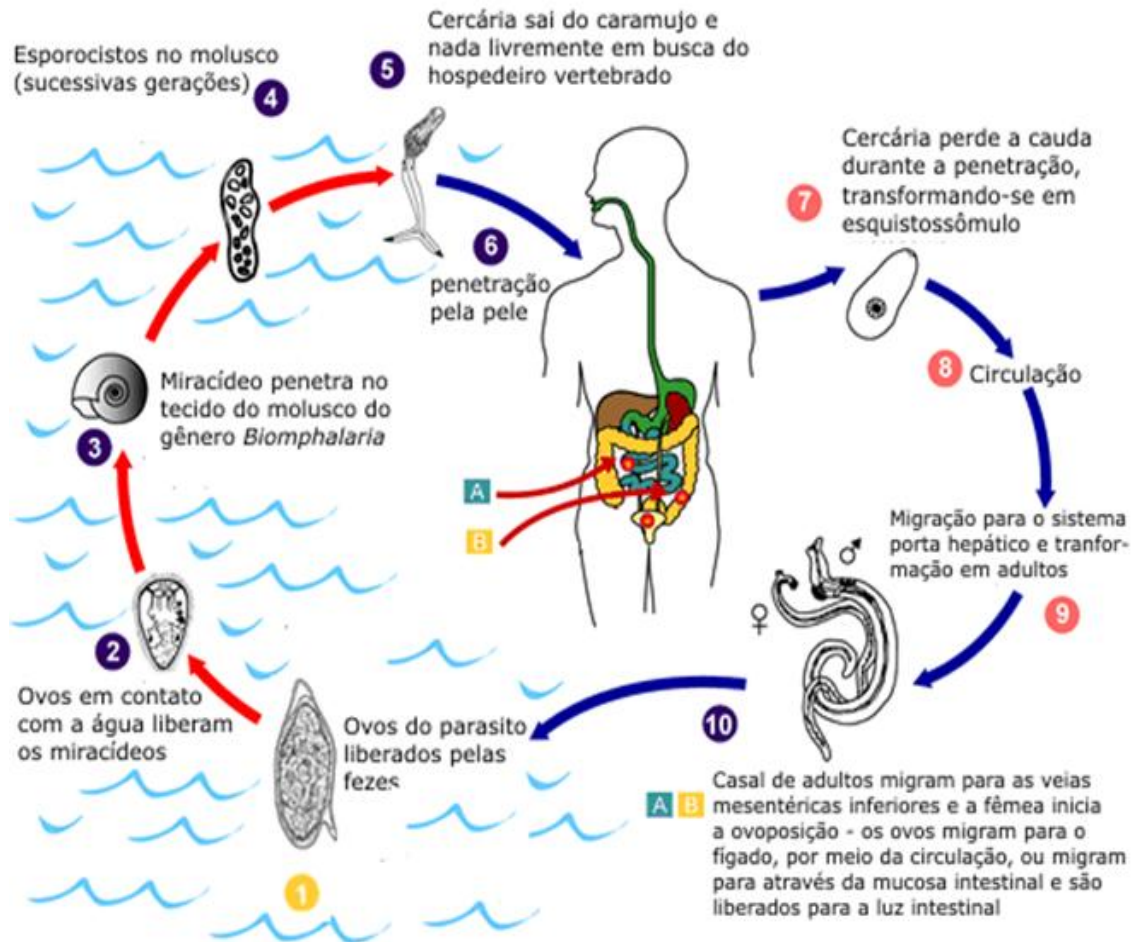


Figura 3. **Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.**
Fonte: CVE (2005).

Os vários aspectos patogênicos e patológicos observados na esquistossomose mansônica dependem da interação parasito-hospedeiro nas três fases evolutivas e migratórias do verme no hospedeiro definitivo: esquistossômulo, verme adulto e ovo. Não há dúvida que, de longe, os ovos e a reação granulomatosa que os envolvem constituem os principais fatores causadores da morbidade. A infecção por *Schistosoma mansoni* costuma ser oligossintomática com predominância intestinal; mas pode produzir alterações anatomopatológicas cujo caráter e gravidade cobre extensa gama de situações, o que imprime a essa doença grande polimorfismo e, em muitos casos, prognóstico incerto. Assim, a esquistossomose deve ser encarada como uma doença de múltiplos mecanismos, com lesões diretamente ligadas à presença local do agente etiológico (cercárias, esquistossômulos, vermes adultos, ovos), alterações hemodinâmicas, alterações de reatividade imunológica, lesões à distância devidas a imunocomplexos, e alterações gerais sobre o organismo, além de interagir e favorecer outras patologias por agentes infecciosos. Nas formas mais graves, há predominância de hepatoesplenomegalia e fibrose periportal. Entre os vários fatores dos quais a patogenia

da helmintose está ligada, os mais importantes são a carga parasitária, que influencia diretamente no número de ovos, e a resposta do sistema imunológico de cada hospedeiro (BLANCHARD, 2004; WYNN et al., 2004; YOSRY, 2006; GRYSEELS et al., 2006; SECOR, 2006; WILSON et al., 2007).

2.2 Controle da esquistossomose mansônica

O controle da esquistossomose permanece um grande desafio para os países endêmicos. As estratégias de controle baseiam-se em programas públicos de saneamento básico, educação sanitária, controle do hospedeiro intermediário e tratamentos das pessoas infectadas. O impacto econômico da esquistossomose é sentido por vários grupos sociais, principalmente pelos países mais pobres e pelas populações que vivem sob condições mais difíceis. O abastecimento de água tratada, as instalações sanitárias e o destino adequado dos esgotos sanitários são os recursos básicos de saneamento que, associados à educação sanitária, constituem o melhor método de controle da doença em médio e longo prazo. Entretanto, tais medidas estão muito distantes nas áreas endêmicas (BERGQUIST, 2002; BROOKER; CLEMENTS; BUNDY, 2006; FENWICK et al., 2006; STEINMANN et al., 2006). Além disso, conscientizar a população e mudar os seus hábitos não é uma tarefa fácil, uma vez que a população, especialmente mulheres e crianças, depende das coleções hídricas para suas atividades domésticas e pessoais, além de usá-las como áreas de lazer (Figura 4).

A transmissão da esquistossomose ocorre devido à presença de moluscos do gênero *Biomphalaria* infectados nas coleções hídricas, por isso, o combate ao hospedeiro intermediário é importante para o controle da doença. Por outro lado, o controle do caramujo é considerado complexo devido seu alto potencial reprodutivo e capacidade de adaptação em diferentes ambientes. Além disso, esses moluscos hermafroditas são capazes de autofecundação e, portanto, repovoar criadouros em um curto período de tempo. O controle de moluscos pode ser feito com alguns métodos, a saber: a) ambientais, como canalização, aterro, assoreamento, drenagem, limpeza de margens; b) biológicos, com a presença de predadores como, por exemplo, peixes e aves, além de microorganismos que podem esterilizar os caramujos e; c) químicos, como adição de substâncias moluscidas. Na prática, no entanto, esses métodos de controle são complexos, dispendiosos, causam alterações no ambiente e dificilmente são empregados nas áreas endêmicas (TELES e CARVALHO, 2008).



Figura 4. **Área que comumente está associado à transmissão da esquistossomose.** Segundo a OMS é o local que normalmente está associado à transmissão da esquistossomose em diversas regiões do mundo.
Fonte: WHO (2009).

Associada à luta antivetorial, ao saneamento do meio e a outras medidas práticas, a quimioterapia é, no entanto, a forma mais eficaz no controle da esquistossomose (FENWICK et al., 2003; HOTEZ et al., 2010; ZHANG et al., 2010). O tratamento desta parasitose sempre foi limitado pela dificuldade de serem encontrados quimioterápicos que exibissem alta eficácia e grande tolerabilidade. No início, na década de 1910, foi utilizado o tártaro emético (tartarato de antimônio e potássio). Em seguida, vários sais de antimônio foram introduzidos em uso clínico, a saber, dissulfonato-bis-pirocatecol de sódio e antimônio (Stibofen), gluconato de antimônio e sódio (Tiofam) e tiomalato de antimônio e sódio (Anthiomaline) administrados por via intramuscular ou intravenosa (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995; CIOLI, 1998). Os derivados antimoniais, que foram a base da quimioterapia da esquistossomose durante quase 50 anos, apesar de atuarem com eficácia contra as três principais espécies do gênero *Schistosoma*, o *S. mansoni*, o *S. haematobium* e o *S. japonicum*, deixaram de ser usados no tratamento desta helmintose, por ocasionarem inúmeros efeitos colaterais e tóxicos, com alterações nas células sanguíneas, além de, não raramente, ocorrência de morte súbita (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995; CIOLI, 1998).

Após a Segunda Guerra Mundial, o cloridrato de 1-N-dietil-amino-etil-amino-4-metil-9-tioxantona, a lucantona (miracil D), passou a ser o primeiro esquistossomicida conhecido de uso oral, mas apenas na década de 1960 houve um avanço na terapia da esquistossomose com o surgimento da hicantona, do niridazol, dos nitrofuranos e do metrifonato. A hidrometilação da lucantona deu origem ao fármaco ativo por via oral e dose única, o 1-N-b-dietil-amino-etil-amino-4-(hidroximetil)-9-tioxantona, a hicantona,

com eficácia, especificamente, contra o *S. mansoni* e o *S. haematobium*. Entretanto, efeitos tóxicos e graves apareceram com o uso da hancantona (Etrenol), causando óbitos, inclusive no Brasil, por lesões hepáticas agudas, o que, portanto, deixou a terapêutica da esquistossomose sem opção (ANDRADE et al., 1974). O niridazol (Ambilhar), outro fármaco de uso oral e eficaz contra *S. haematobium* e *S. japonicum*, exigia administração por cerca de uma semana; no entanto, apresentava baixa tolerância, especialmente causando convulsão, alucinação e outros efeitos indesejáveis sobre o sistema nervoso central, além de lesões hepáticas e renais. O niridazol também apresentou mutagenicidade, carcinogenicidade, ação imunossupressora e, por conta disso, teve seu uso proscrito (KATZ, 1977; CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995). Ainda na década de 1960, dois compostos surgiram para o tratamento da esquistossomose: os nitrofuranos e o metrifonato. Os nitrofuranos são antimicrobianos de amplo espectro e foram utilizados pelos chineses em pessoas infectadas com *S. japonicum*; entretanto, a ação esquistossomicida era somente em doses que apresentavam toxicidade ao hospedeiro e, portanto, logo deixou de ser utilizado. No mesmo período, o metrifonato, um organofosforado inibidor de acetilcolinesterase, passou a ser utilizado; mas seu uso, que ainda persiste até os dias de hoje, tem sido limitado aos casos de esquistossomose urinária (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995).

Na década de 1970, funcionários da indústria farmacêutica Pfizer (Sandwich, Inglaterra) descreveram uma série de derivados 2-aminometil-tetra-hidroquinolínicos que apresentaram ação marcante esquistossomicida, sendo que o mais promissor foi o UK-3883. Esse composto, além de ação curativa em dose oral única, apresentou também atividade profilática e ação contra todos os estágios em camundongos. A hidroxilação do grupo 6-metil deu origem ao UK 4271, posteriormente denominado oxamniquina, na qual em dose oral única apresenta elevada atividade curativa contra *S. mansoni* em roedores e primatas. Em todos os hospedeiros, os vermes machos mostraram-se mais susceptíveis à droga do que as fêmeas. O novo esquistossomicida recebeu o nome comercial de Mansil[®], que é uma mistura das palavras "mansoni" e "Brasil", onde foram realizados os primeiros ensaios clínicos com essa droga. Ensaios clínicos no Brasil mostraram que a dose oral única de 15 mg/kg a 20 mg/kg apresentava boa tolerância, poucos efeitos tóxicos e índice de cura de até 90% nos pacientes. Apesar do registro de alguns efeitos colaterais como tonturas, náuseas, cefaléia e sonolência, os ensaios clínicos demonstraram boa aceitação pela população pesquisada e impacto imediato sobre as manifestações clínicas, além de reduzir a prevalência da parasitose. Dessa forma, assim, esses resultados favoráveis permitiram que o fármaco pudesse ser aplicado a milhares de pessoas, sem grandes riscos, pelo Ministério da Saúde brasileiro por iniciativa do Programa Especial de Controle da Esquistossomose (PECE). Após mais de 13 milhões de

tratamentos realizados nas áreas endêmicas de esquistossomose pode-se concluir que a oxamniquina é um fármaco eficaz para tratamento individual ou em larga escala, mas chama a atenção que seu preço elevado é um fator limitante a sua maior disseminação, principalmente como medida de saúde pública. A oxamniquina é ineficaz nas outras espécies de *Schistosoma* e seu uso ficou mais direcionado aos países da América do Sul, principalmente o Brasil. A oxamniquina é mais ativa para eliminar os machos do que as fêmeas do parasita, no entanto as fêmeas que sobrevivem ao tratamento deixam de colocar ovos, cessando assim a progressão da doença. A oxamniquina provoca o desprendimento dos parasitas dos seus lugares de fixação no interior das veias mesentéricas e são arrastados então até o fígado onde são destruídos. O mecanismo de ação da oxamniquina parece estar relacionado com sua capacidade de inibição da síntese de ácidos nucléicos nos vermes. Diversos relatos de resistência, efeitos colaterais consideráveis, alto custo e especificidade somente com uma espécie de esquistosoma estão tornando o uso da oxamniquina cada vez mais restrito (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1993, 1995).

Na década de 1970, ainda, iniciaram-se estudos conjuntos entre os laboratórios Bayer e Merck com derivados de pirazinoisoquinolínicos como antiparasitários. Após síntese de mais de quatrocentos compostos o mais promissor revelou ser o {2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexa-hidro-4H-pirazino[2,1-a]isoquinolina-4-one}, praziquantel. Além da atividade tóxica em cestóides e trematóides, o praziquantel foi o primeiro fármaco que mostrou atividade acentuada, por via oral ou intramuscular, em dose única, contra todas as espécies de *Schistosoma* que acometem o homem. A ação anti-helmíntica do praziquantel deve-se provavelmente na alteração dos canais de Ca^{2+} dos esquistossomos, aumentando a permeabilidade da membrana do helminto a certos cátions monovalentes e divalentes, principalmente o cálcio, o que leva à intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia espástica. Como consequência, os helmintos se separam dos tecidos do hospedeiro e são rapidamente deslocados das veias mesentéricas para o fígado e, após algumas horas, há vacuolização em diferentes partes do tegumento. Assim, são três as principais ações do praziquantel sobre os vermes: contração muscular, lesão do tegumento e alterações metabólicas. Atualmente, o praziquantel é o único fármaco recomendado pela OMS (MEHLHORN et al., 1981; DOENHOFF; KIMANI; CIOLI, 2000; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008; CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; WHO, 1985, 2002).

Nos últimos 30 anos houve uma significativa melhora na eficiência terapêutica do tratamento contra a esquistossomose com a introdução do praziquantel, que, administrado em dose única, por via oral, apresenta atividade terapêutica elevada. O tratamento com praziquantel (40 mg/kg a 60 mg/kg, dependendo da espécie de *Schistosoma*) é eficaz na redução da morbidade, porém os resultados com o uso dessa

droga têm sido menos promissores do que o esperado. Além de não atuar nas formas jovens do parasita, existem relatos de resistência ao fármaco (BENNET et al., 1997; CIOLI et al., 2000; LIANG et al., 2001; DOENHOFF; KIMANI; CIOLI, 2000; DOENHOFF et al., 2002; CIOLI e PICA-MATTOCCIA, 2003; GRYSEELS et al., 2001; FENWICK e WEBSTER, 2006).

A população que reside em área endêmica de esquistossomose precisa ser submetida a tratamentos sequenciais, existindo, portanto, a possibilidade da seleção de linhagens de *S. mansoni* resistentes aos fármacos. Rogers e Bueding (1971) demonstraram, pela primeira vez, a existência de uma linhagem de *S. mansoni* resistente a um agente esquistossomicida; no caso, a hicantona. No Brasil, a resistência à hicantona foi relatada pela primeira vez por Katz et al. (1973). Vários estudos posteriores confirmaram a presença de linhagens resistentes aos agentes esquistossomicidas, incluindo oxamniquina e praziquantel (DIAS et al., 1978; De SOUZA DIAS; de JESUS PEDRO; DEBERALDINI, 1982; COLES et al., 1987; CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1993; FALLON e DOENHOEF, 1994; ISMAIL et al., 1996, 1999; COELHO; LIMA e SILVA; NOGUEIRA-MACHADO, 1997; CONCEIÇÃO; ARGENTO, CORRÊA, 2000; LIANG et al., 2001; WILLIAN et al., 2001).

O desenvolvimento de tolerância ou resistência ao praziquantel justifica a pesquisa e produção de novas drogas para prevenção e cura da esquistossomose. De fato, desde a descoberta do praziquantel nos anos 1970, pouco avanço terapêutico foi alcançado. Estudos nos anos 1980 demonstram atividade esquistossomicida promissora do imunossupressor ciclosporina A (BOUT; DESLÉE; CAPRON, 1984, 1986; CHAPPELL et al., 1987). Entretanto, investigações ainda estão sendo realizadas com o intuito de elucidar o mecanismo de ação e possíveis efeitos adversos (CIOLI, 1998). No início da década de 1980, a artemisina, uma lactona sesquiterpênica obtida das folhas de *Artemisia annua*, e derivados, especialmente o arteméter e o artenusato, foram utilizados como agente esquistossomicida na China, inicialmente com o *S. japonicum*; posteriormente, ficou demonstrado que os compostos possuem atividade esquistossomicida contra as outras espécies que parasitam o homem (XIAO et al., 2002; UTZINGER et al., 2001, 2003). Diferentemente da oxamniquina e do praziquantel, a atividade dos derivados de artemisina é maior nas formas jovens do que nos vermes adultos (XIAO et al., 2002). Por apresentar atividade acentuada contra vermes imaturos, o arteméter vem sendo ensaiado, em áreas endêmicas, como droga profilática na esquistossomose; mas com atenção, pois o arteméter é um importante antimalárico e seu uso inapropriado poderá causar o aparecimento de resistência nos agentes etiológicos da malária (CHIPPAUX et al., 2003; FENWICK et al., 2003; UTZINGER et al., 2001, 2003; KEISER et al., 2009).

No século XXI, intensificou-se a busca por novos compostos com características esquistossomicidas, mas ainda falta a avaliação na terapêutica clínica (Tabela 1). Abdulla et al. (2007) mostraram que o vinil sulfona K11777, um inibidor de cisteíno protease, possui interessante efeito esquistossomicida. Esses inibidores de proteases também são potenciais fármacos para a doença de Chagas (BARR et al., 2005). Embora tenha mostrado redução significativa da carga parasitária de camundongos infectados, o mecanismo de ação e possíveis efeitos adversos precisam ser investigados durante a terapêutica experimental (ABDULLA et al., 2007). No mesmo ano de 2007, foram assinalados que os antimaláricos trioxolanos possuem considerável atividade esquistossomicida (XIAO et al., 2007). Posteriormente, Sayed et al. (2008) descreveram que oxadiazóis são esquistossomicidas quando administrados, diariamente, por até cinco dias, em camundongos infectados com *S. mansoni*. A mefloquina, um aminoálcool usado como antimalárico, é um composto promissor, pois apresenta efeito esquistossomicida em parasitas jovens e adultos quando administrados por via oral em camundongos (VAN NASSAUW et al., 2008; KEISER et al., 2009). Mais recentemente, El Ridi et al. (2010) mostraram, em *S. mansoni* e *S. haematobium*, que o ácido araquidônico apresenta propriedade esquistossomicida. Finalmente, em 2011 foi mostrado que a miltefosina, um importante fármaco para o tratamento de leishmaniose, também reduz a carga parasitária de camundongos com esquistossomose mansônica (EISSA et al., 2011). Na Tabela 1 está uma lista de compostos esquistossomicidas utilizados na terapêutica experimental ou clínica da esquistossomose.

Considerando a dificuldade na descoberta de esquistossomicidas, a alternativa pode estar nos produtos naturais. De fato, a atividade anti-helmintica de plantas é bem conhecida na medicina tradicional em muitas regiões do mundo. Extratos de diferentes partes de plantas ou de seus frutos são preparados por curandeiros, que representam o conhecimento empírico e cultural em comunidades do mundo inteiro (NDAMBA et al., 1994; CLARK; APPLETON; KVALSVIG, 1997; SPARG et al., 2000; MOLGAARD et al., 2001). Na Ásia e África existem diversas evidências de que preparados como esses são eficazes contra parasitas, o que destaca a fitoterapia como uma ferramenta em potencial para o controle das parasitoses. O modo de ação ou substância química que causa dano ao parasita foi muito pouco investigado. São necessários, portanto, mais estudos para confirmar o real valor terapêutico dessas plantas no tratamento das doenças parasitárias (NDAMBA et al., 1994; CLARK; APPLETON; KVALSVIG, 1997; SPARG et al., 2000; MOLGAARD et al., 2001). Nesse contexto, a busca por extratos e compostos naturais com propriedades esquistossomicidas tem aumentado nos últimos anos. A tabela 2 apresenta uma lista de extratos ou compostos naturais que são tóxicos, *in vitro*, para os esquistossomos.

Tabela 1 - **Compostos com características esquistossomicidas usados na terapêutica experimental ou clínica da esquistossomose**

Data*	Compostos	Observações
1918	Antimoniais ^a	Altamente tóxicos
1920	Emetina ^a	Moderadamente efetivo; tóxico
1960	Metrifonato ^a	Ainda usado em <i>S. haematobium</i>
1962	Nitrofuranos ^a	Moderadamente efetivo
1962	Lucantona ^a	Substituído pela hicantona
1964	Niridazol ^a	Oral; moderadamente efetivo
1965	Hicantona ^a	Uso descontinuado por mutagenicidade
1969	Oxamniquina ^a	Ainda usado em <i>S. mansoni</i>
1971	Tubercidina ^a	Ativo em animais; nenhum teste em humanos
1976	Amoscanato ^a	Amplamente testado na China; tóxico
1977	Praziquantel ^a	Fármaco de escolha para todas as esquistossomoses
1978	Ro 11-3128 ^a	Benzodiazepínico: efetivo em vermes imaturos
1978	Oltipraz ^a	Uso descontinuado por causar problemas na unha
1981	Ciclosporina A ^a	Ativo em animais; nenhum teste em humanos; curativo e profilático
1984	9-Acridanona-hidrazona ^a	Ativo em animais; nenhum teste em humanos
1980	Artemisina ^b	Moderadamente efetivo; baixa solubilidade
1982	Arteméter ^b	Efetivo em vermes imaturos
1983	Artenusato ^b	Efetivo em vermes imaturos
2007	Vinil sulfona K11777 ^c	Ativo em animais; nenhum teste em humanos
2007	Trioxalanos ^d	Moderadamente efetivo em parasitas jovens e adultos; ativo em animais; nenhum teste em humanos
2008	Oxadiazóis ^e	Moderadamente efetivo em parasitas jovens e adultos; ativo em animais; nenhum teste em humanos
2008	Mefloquina ^{f,g}	Oral; efetivo em parasitas jovens e adultos; ativo em animais; nenhum teste em humanos
2010	Ácido aracdônico ^h	Oral; efetivo em parasitas jovens e adultos; ativo em animais; nenhum teste em humanos
2011	Miltefosina ⁱ	Oral; efetivo em parasitas jovens e adultos; ativo em animais; nenhum teste em humanos

* Data da publicação ou início dos ensaios.

^a(CIOLI, 1998). ^b(UTZINGER et al., 2001). ^c(ABDULLA et al., 2007). ^d(XIAO et al., 2007). ^e(SAYED et al., 2008). ^f(Van NASSAUW et al., 2008). ^g(KEISER et al., 2009). ^h(EL RIDI et al., 2010). ⁱ(EISSA et al., 2011).

Tabela 2 - Extratos ou compostos naturais com efeito esquistossomicida, in vitro, em *Schistosoma mansoni*

Data*	Extrato/ Composto	Vegetal	Nome popular	Observações
2001	Extrato de caule e raiz ^a	<i>Abrus precatorius</i> L. (Fabaceae)	Jequiriti, olho-de-pombo, olho-de-cabra	Ativo em esquistossômulos recém-transformados (caule 1.500 µg/ml e raiz 600 µg/ml); nenhum teste de citotoxicidade
2001	Extrato da casca de caule ^a	<i>Elephantorrhiza goetzei</i> Harms (Mimosaceae).	---	Ativo em esquistossômulos recém-transformados (800 µg/ml); nenhum teste de citotoxicidade
2001	Extrato de folha e casca da raiz ^a	<i>Ozoroa insignis</i> Del. (Anacardiaceae)	---	Ativo em esquistossômulos recém-transformados (folha 33.800 µg/ml e caule 25.300 µg/ml); nenhum teste de citotoxicidade
2005	Extrato de rizoma ^b	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe (Zingiberaceae)	Gengibre, mangaratá	Machos mais susceptíveis que as fêmeas; redução na oviposição; nenhum teste em esquistossômulos
2005	Extrato de semente ^c	<i>Nigella sativa</i> L. (Ranunculaceae)	Alprive, cominho, diabo-na-mata	Machos mais susceptíveis que as fêmeas; redução na oviposição; nenhum teste em esquistossômulos
2009	Extratos e compostos de folha ^d	<i>Zanthoxylum naranjillo</i> Griseb (Rutaceae)	Juva, naranjillo, tembetari	Ativo em vermes adultos; reduz a oviposição; nenhum teste em esquistossômulos
2009	Curcumina Isolado de rizoma ^e	<i>Curcuma longa</i> L. (Zingiberaceae)	Gengibre, açafraão, cúrcuma	Ativo em vermes adultos; reduz a oviposição; nenhum teste em esquistossômulos
2010	Óleo essencial de folha ^f	<i>Baccharis dracunculifolia</i> DC. (Asteraceae)	Alecrim do campo	Ativo em vermes adultos; nenhum teste em esquistossômulos
2010	Floroglucínóis (aspidina, aspidinol, ácido flavaspídico e desaspidina) obtidos do rizoma ^g	<i>Dryopteris</i> sp (Dryopteridaceae)	Samambaia	Ativo em vermes adultos; reduz a oviposição; nenhum teste em esquistossômulos
2011	Óleo essencial ^h	<i>Ageratum conyzoides</i> L. (Asteraceae)	Mentrato	Ativo em vermes adultos; reduz a oviposição; nenhum teste em esquistossômulos

* Data da publicação.

^a(MØLGAARD et al., 2001). ^b(SANDERSON; BARTLETT; WHITFIELD, 2005). ^c(MOHAMED et al., 2005). ^d(BRAGUINE et al., 2009). ^e(MAGALHÃES et al., 2009). ^f(PARREIRA et al., 2010). ^g(MAGALHÃES et al., 2010). ^h(de MELO et al., 2011).

As estratégias da quimioterapia podem ser direcionadas para toda a população de uma determinada área endêmica (quimioterapia em massa) ou segmentos da população (quimioterapia dirigida). A disponibilidade de apenas um fármaco para o tratamento de dezenas de milhões de pessoas com esquistossomose é um fato preocupante nos últimos anos. É possível que com o advento do praziquantel, associado à ocorrência da esquistossomose em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, o que implica, portanto, na baixa capacidade de compra, tenha feito com que as indústrias farmacêuticas não se interessem em promover investimentos vultosos para descobrir novos fármacos contra essa importante parasitose (TOUILLER et al., 2002; HOTEZ et al., 2007). Nesse sentido, a OMS classificou a esquistossomose como uma doença negligenciada (REMME et al., 2002; FENWICK et al., 2003; CAFFREY, 2007). E, de fato, a falha no sistema em vigor para desenvolver novos fármacos de interesse foi enfatizada pela organização não governamental *Médecins Sans Frontières* (MSF, em português: Médicos Sem Fronteiras), que salientou a necessidade de haver novas iniciativas, envolvendo órgãos públicos, instituições de pesquisas e unidades de produção. A organização MSF destinou os recursos recebidos pelo Prêmio Nobel da Paz, em 1999, ao desenvolvimento de um modelo alternativo de pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos para tratar as doenças negligenciadas. Como resultado dessa ação, em 2003, sete organizações de diferentes países uniram esforços para fundar a iniciativa *Drugs for Neglected Diseases initiative* (DNDi, em português: Medicamentos para Doenças Negligenciadas).

Acredita-se que a alternativa pode estar na exploração dos produtos naturais (BLEICHER et al., 2003). Tendo em vista a biodiversidade no território brasileiro, o Bioprospecta, em associação com o Programa Biota/FAPESP, iniciou um programa que procura drogas potenciais no tratamento de doenças tropicais e outras patologias. Os estudos de bioprospecção visam à descoberta de produtos biologicamente ativos (como esquistossomicidas), esperando contribuir para programas de desenvolvimento auto-sustentável, pelo uso de produtos naturais. Nesse sentido, a triagem de compostos e extratos esquistossomicidas *in vitro* apresenta uma abordagem inicialmente importante.

Neste trabalho é apresentado o efeito de 4 compostos isolados de espécies vegetais, 1 composto isolado da pele de anfíbio e 6 extratos etanólicos obtidos de vegetais em adultos e esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*. Os resultados e discussões estão divididos em 6 partes, sendo complementados por 3 artigos que estão anexados no final do manuscrito.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o efeito in vitro de compostos (epiisopiloturina, grandisina, piperina, piplartina e dermaseptina 01) e extratos (*Piper tuberculatum*, *P. crassinervium*, *P. diospyrifolium*, *P. fuligineum*, *P. gaudichaudianum* e *Pothomorphe umbellata*) naturais em *Schistosoma mansoni*.

3.2 Específicos

- 1) Avaliar a viabilidade de vermes adultos em presença de compostos e extratos;
- 2) Avaliar o efeito de compostos e extratos no tegumento de vermes adultos;
- 3) Avaliar a capacidade reprodutiva, pelo acasalamento e oviposição dos parasitas, quando em presença de compostos e extratos;
- 4) Avaliar o efeito de compostos e extratos na viabilidade e no tegumento de esquistossômulos;
- 5) Avaliar a toxicidade de compostos e extratos em células de mamífero.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais utilizados e manutenção do ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni*

4.1.1 Linhagem do *Schistosoma mansoni*

A linhagem de *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 utilizada neste trabalho foi a BH (Belo Horizonte, MG), mantida no Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan (São Paulo, SP). Os parasitas foram mantidos em caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (hospedeiro intermediário) e hamsters *Mesocricetus auratus* Waterhouse, 1839 (hospedeiro definitivo).

4.1.2 Animais hospedeiros

Os caramujos são procedentes de Barreiro de Baixo (Belo Horizonte, MG, Brasil). Eles foram mantidos em aquários de polietileno (55 x 22 x 17 cm) com cerca de 20 litros de água desclorada, em temperatura de 24 °C, e alimentados com alface fresca; os aquários eram arejados com bombas de 1,5 W (MORAES et al., 2009).

Os hamsters foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Eles foram mantidos em caixas de polipropileno (40 x 34 x 16 cm) com tampa metálica e alimentados com ração e água *ad libitum*. Esses roedores eram recém-desmamados, de um único sexo, com massa de aproximadamente 20 g e 21 dias de idade. Os animais eram acomodados em maravalha com duas trocas semanais.

4.1.3 Manutenção do ciclo evolutivo de *Schistosoma mansoni*

A manutenção do ciclo evolutivo de *S. mansoni* foi feita de acordo com Pellegrino e Katz (1968). Os hamsters foram infectados subcutaneamente (com seringa de 1 ml) com cerca de 150 cercárias. Após 49 dias, os roedores eram sacrificados em câmara de CO₂ para a retirada do fígado e obtenção dos miracídios. Os fígados eram triturados em liquidificador em solução salina 0,85% (m/v), e a suspensão dos tecidos homogeneizados era deixada para sedimentação no escuro. Após lavagens por decantações sucessivas, o sedimento era suspenso com água desclorada e exposto à luz para obtenção dos miracídios. O número e a viabilidade dos miracídios e cercárias foram determinados com o auxílio de um estereomicroscópio (PELLEGRINO e KATZ, 1968).

Para a infecção do hospedeiro intermediário foram utilizados 10 miracídios por caramujo. Os moluscos sexualmente maduros eram colocados, individualmente, em placas de cultura de células (24 poços) contendo água filtrada. A exposição do molusco aos miracídios foi realizada sob a luz artificial (lâmpada incandescente de 60 W) a uma distância de aproximadamente 30 cm, durante 3 a 4 horas. Tal procedimento promove

aumento da temperatura para cerca de 30 °C. Após 35 a 40 dias, os caramujos eram examinados, colocando-os individualmente em placas de 24 poços e expostos à luz artificial para a eliminação das cercárias, durante 2 a 3 horas. Os exemplares infectados foram protegidos da luz com a colocação de papel escuro em torno do aquário para evitar a liberação de cercárias (PELLEGRINO e KATZ, 1968).

Para infecção do hospedeiro definitivo, cerca de 30 caramujos infectados eram transferidos para um recipiente de vidro tipo Becker (Vidrolabor[®], Laborquimi LTDA, Poá, SP, Brasil) contendo água desclorada e expostos à luz artificial para liberação de cercárias. Para concentração cercariana, os parasitas eram transferidos para tubos de ensaio em vidro com capacidade de 40 ml (Pyrex[®], Corning Incorporated, Corning, NY, USA) parcialmente protegidos da luz com papel alumínio, de modo que a entrada de luz era somente no ápice. As cercárias foram utilizadas na infecção dos hamsters (PELLEGRINO e KATZ, 1968).

4.2 Compostos e extratos vegetais

Os compostos pipartina, piperina e grandisina e os extratos etanólicos obtidos das folhas ou flores de *Piper tuberculatum* Jacq., *Piper crassinervium* Kunth, *Piper diospyrifolium* Kunth, *Piper fuligineum* Kunth, *Piper gaudichaudianum* Kunth e *Pothomorphe umbellata* (L.) Miq. foram cedidos pelo prof. Dr. Massuo J. Kato (Laboratório de Química de Produtos Naturais, Departamento de Química Fundamental, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, IQ-USP). Os compostos dermaseptina 01 e epiisopiloturina foram cedidos pelo prof. Dr. José Roberto S. A. Leite (Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí, UFPI). Como controle positivo foi utilizado o praziquantel, um fármaco comumente comercializado (Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO, USA ou Cestox[®], Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ, Brasil). A origem e a característica dos compostos e extratos utilizados para verificar o efeito em *Schistosoma mansoni* são mostradas nas Tabelas 3 e 4, enquanto que as estruturas químicas das moléculas e a sequência primária do peptídeo estão na Figura 5.

Tabela 3 - Grupo químico e origem dos compostos selecionados para verificar o efeito in vitro em adultos e esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*

Composto e massa molar (g/mol)	Grupo químico	Parte vegetal/animal	Espécie	Nome popular	Referência
Epilobatulina (286,13)	alcaloide	folhas	<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Holm. (Rutaceae) ^a	jaborandi	Miura et al. (2010)
Grandisina (432,51)	lignana	folhas	<i>Piper solmsianum</i> C. DC. (Piperaceae) ^b	caapeba, pariparoba	Martins et al. (2000)
Piperina (285,34)	amida	frutos	<i>Piper nigrum</i> L. (Piperaceae) ^c	pimenta-do-reino	Marques et al. (2010)
Piplartina (317,34)	amida	folhas	<i>Piper tuberculatum</i> Jacq. (Piperaceae) ^d	pimenta-longa, pimenta-d'arda, pimenta-de-macaco	Navickiene et al. (2000)
Deramaseptina 01* (2793,89)	peptídeo	pele	<i>Phyllomedusa oreades</i> (Brandão, 2002) (Hyliidae) ^e	perereca-da-folhagem	Brand et al. (2002)
Praziquantel [†] (312,41)	pirazino-isoquinolina	---	---	---	---

^a Identificação pela Dra. Ivanilza Moreira de Andrade (Departamento de Biologia, Campus Ministro Reis Velloso, UFPI). Exsicata (TEPB 27152) depositada no Herbário do Centro de Ciências da Natureza, UFPI, Teresina, PI.

^b Identificação pela Dra. Elsie Franklin Guimarães (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro). Exsicata (329676) depositada no Herbário do Jardim Botânico, Rio de Janeiro, RJ.

^c Adquirida no comércio local (São Paulo, SP).

^d Identificação pelo Dr. Guillermo E. D. Paredes (Universidad Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Peru). Exsicata (Kato-0163) depositada no Herbário do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, IB-USP, São Paulo, SP.

^e Identificação pelo Dr. Reuber A. Brandão (Departamento de Engenharia Florestal, Faculdade de Tecnologia, Universidade de Brasília, FT-UNB). Anfíbio capturado na Serra da Mesa (Goiás) com autorização do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Renováveis (IBAMA, Licença 097/96-DIFAS, Processo 0637/91A.C).

^{b,c,d} Vegetais coletados no campus da Universidade de São Paulo.

^a Vegetal coletado na plantação da indústria farmacêutica Vegeflorea Extrações do Nordeste LTDA (Parnaíba, PI), empresa do Grupo Centoflora.

* Composto sintetizado no Laboratório de Espectrometria de Massa, Centro de Biotecnologia e Nanotecnologia, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA.

[†] Fármaco adquirido em comércio (Sigma-Aldrich ou Cestox®, Merck).

Tabela 4 - **Espécies vegetais e origem dos extratos selecionados para verificar o efeito in vitro em adultos e esquistossômulos de *Schistosoma mansoni***

Extrato etanólico (parte da planta)	Espécie vegetal *	Nome popular
Folhas	<i>Piper crassinervium</i> Kunth ^a	papiroba, jaguarandy, jaborandi
Folhas	<i>Piper diospyrifolium</i> Kunth ^b	joão-borandi, pau-de-junta
Folhas	<i>Piper fuligineum</i> Kunth ^c	jaborandi, pimenta
Folhas	<i>Piper gaudichaudianum</i> Kunth ^d	paripaioba, pariparoba
Flores	<i>Piper tuberculatum</i> Jacq. ^e	pimenta-longa, pimenta- d'arda, pimenta-de-macaco
Folhas	<i>Pothomorphe umbellata</i> (L.) Miq. ^f	capeba, cipó-de-cobra, pariparoba, periparoba, pimenta-longa

* Espécies da família Piperaceae, coletadas nas dependências do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

^{a,e} Identificação pelo Dr. Guillermo E. D. Paredes (Universidad Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Peru).

^{b,c,d,f} Identificação pela Dra. Elsie Franklin Guimarães (Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, RJ).

^{a,d,e,f} Depósito no Herbário do Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, IB-USP, São Paulo, SP.

^{b,c} Depósito no Herbário do Jardim Botânico, Rio de Janeiro, RJ.

^a Exsicata (Kato-0084).

^b Exsicata (Kato-0431).

^c Exsicata (Kato-0979).

^d Exsicata (Kato-0093).

^e Exsicata (Kato-0163).

^f Exsicata (Kato-0031).

4.3 Preparo das amostras

Os extratos e compostos foram recebidos secos, em frascos de vidro tipo âmbar ou em microtubos incolores de polipropileno protegidos da luz com papel alumínio, e conservados em temperatura ambiente em um local isento de umidade. No momento do uso, de 1 mg a 4 mg de extratos ou compostos eram transferidos, individualmente, em tubos de polipropileno de fundo cônico com capacidade de 1,5 ml (Axygen Inc, Union City, CA, USA) e dissolvidos em dimetilsulfóxido 100% (DMSO, Merck); exceto a dermaseptina 01, pois apresenta alta solubilidade em água. Posteriormente, adicionou-se meio "Roswell Memorial Park Institute" (RPMI 1640) para obter uma concentração, de compostos ou extratos, de 1000 µg/ml a 4000 µg/ml em DMSO 2% (v/v). O meio RPMI continha L-glutamina e vermelho de fenol (pó para preparo de 1 litro; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e era esterilizado por filtração. Para os ensaios com célula de mamífero empregou-se o meio Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), como descrito no item 4.8, ao invés do meio RPMI. Os compostos e extratos foram testados nos ensaios descritos nos itens 4.4.2, 4.5.2 e 4.8.2.

Quanto à solubilidade das amostras, os compostos piplartina e epiisopiloturina, assim como todos os extratos vegetais são muito solúveis em DMSO e, portanto, não apresentaram dificuldades durante o preparo. Por outro lado, grandisina, piperina e praziquantel são pouco solúveis e, mesmo no solvente, foi necessária uma agitação por tempo mais prolongado (cerca de 5 minutos), utilizando um agitador de tubo, tipo Vortex (modelo AP 56, Phenix LTDA, Araraquara, SP, Brasil).

4.4 Recuperação dos vermes adultos e ensaios in vitro

4.4.1 Recuperação dos vermes adultos

Os adultos de *S. mansoni*, com 49 dias de idade, foram recuperados por perfusão do sistema porta hepático como descrito por Smithers e Terry (1965). A perfusão foi realizada com meio RPMI 1640 contendo L-glutamina e vermelho de fenol (pó para preparo de 1 litro, Cultilab) e heparina sódica 5 UI/ml (Liquemine[®], Roche, São Paulo, SP, Brasil). Os hamsters foram sacrificados por inalação de CO₂ e, posteriormente, fez-se uma secção longitudinal na região ventral, expondo-se os órgãos internos. A veia porta foi seccionada e, com o auxílio de uma agulha acoplada a uma bomba peristáltica, injetou-se meio de cultura diretamente no coração do animal para coleta dos vermes adultos (SMITHERS e TERRY, 1965).

4.4.2 Ensaios in vitro com vermes adultos

Os ensaios in vitro com adultos de *S. mansoni* foram realizados com machos e fêmeas acasalados. Os pares de vermes obtidos dos hamsters por perfusão foram lavados 2 vezes com o meio RPMI 1640 (descrito no item 4.4.1), esterilizado por filtração (Corning), contendo penicilina 200 U/ml, estreptomicina 200 µg/ml e anfotericina B 2 µg/ml (Cultilab); procedimento este feito em placa de Petri de polietileno estéril, com duas divisões (90 mm x 15 mm). Posteriormente, os parasitas acasalados foram transferidos em placas para cultura de células com 24 poços (TTP[®], Techno Plastic Products, St. Louis, MO, USA) contendo, por poço, 1 casal de vermes em 2 ml do meio RPMI 1640 supracitado, porém o meio era suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e tamponado com HEPES 25 mM (Sigma-Aldrich) (XIAO e CATTO, 1989; RAMIREZ et al., 2007; XIAO et al., 2007; EL RIDI et al., 2010; MORAES et al., 2011a, 2011b).

Diferentes concentrações de compostos e extratos foram diluídas no meio de cultura antes da adição dos parasitas, sendo que concentração final de DMSO não foi superior a 0,2%. Praziquantel 3 µg/ml foi utilizado como controle positivo e poços contendo somente meio de cultura ou meio com DMSO 0,2% foram usados como controle negativo. As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera de CO₂ a 5% (estufa Revco[®], Thermo Electron Corporation, Barrington, IL, USA) e foram monitoradas diariamente por 5 dias, com o auxílio de um microscópio invertido e um estereomicroscópio (SMZ 1000, Nikon, Melville, NY, U.S.A) (XIAO e CATTO, 1989; RAMIREZ et al., 2007; XIAO et al., 2007; MORAES et al., 2011a, 2011b).

4.5 Obtenção de esquistossômulos de diferentes idades e ensaios in vitro

4.5.1 Obtenção de esquistossômulos

As cercárias foram mecanicamente transformadas em esquistossômulos pelo método de Ramalho-Pinto et al. (1974) e os parasitas foram cultivados in vitro como descrito por Basch (1981). As cercárias foram concentradas (como descrito no item 4.1.3), distribuídas em tubos de polipropileno de fundo cônico com capacidade de 50 ml (Corning ou Falcon, Laboratories Inc Pecan St. Colorado Springs, CO, EUA) e deixadas em banho de gelo por 30 minutos. Após centrifugação a 200 x g, por 2 minutos a 4 °C (centrífuga modelo 5810R, Eppendorf, Barkhausenweg, Hamburg, Germany), os parasitas eram ressuspensos em meio RPMI 1640 contendo antibióticos, mas sem soro (como descrito no item 4.3), e foram submetidos à transformação mecânica utilizando-se um agitador de tubos, tipo Vortex (Phenix), com rotação entre 3000 rpm e 3800 rpm por

cerca de 90 minutos (RAMALHO-PINTO et al., 1974; KEISER, 2010). A suspensão com corpos cercarianos (esquistossômulos) e caudas era transferida para garrafas plásticas para cultura de células (área de 75 cm², TPP) contendo meio RPMI e então mantidas a 37 °C, em atmosfera de CO₂ a 5% (BASCH, 1981). Após 3 horas de incubação, as culturas foram lavadas por centrifugação (250 x g, 1 minuto) ou decantação sucessiva (por cerca de 8 minutos) para separar o esquistossômulo da cauda cercariana.

4.5.2 Ensaios *in vitro* com esquistossômulos

Os esquistossômulos foram incubados em meio 169 por até sete dias antes da realização dos ensaios. Os experimentos foram realizados com esquistossômulos recém-transformados, 1, 3, 5 e 7 dias de idade, sendo que a idade desses parasitas jovens foi contada *in vitro* (BASCH, 1981a). De fato, neste meio de cultura o parasita é capaz de sobreviver por semanas, preservando sua capacidade de desenvolvimento no hospedeiro (BASCH, 1981a, 1981b; BASCH e HUMBERT, 1981). A composição do meio 169 está descrita na Tabela 5.

Os esquistossômulos foram distribuídos em placas para cultura de células, com 96 poços de fundo chato (Corning ou TPP), contendo, por poço, cerca de 50 parasitas em meio 169, e então mantidos a 37 °C, em atmosfera de CO₂ a 5%. Após diferentes tempos, o sobrenadante foi recolhido e o meio 169 contendo compostos ou extratos em DMSO 0,2% foi adicionado às culturas. Praziquantel com diferentes concentrações foi utilizado como controle positivo e poços contendo somente meio de cultura ou meio com DMSO 0,2% foram usados como controle negativo. As culturas foram mantidas a 37 °C, em atmosfera de CO₂ a 5%, e monitoradas diariamente por 5 dias, com o auxílio de um microscópio invertido (ABDULLA et al., 2009). Os esquistossômulos foram monitorados quanto à viabilidade e as alterações no tegumento, como descrito no item 4.6.2.

Tabela 5 - **Composição do meio 169**

Componentes	Concentração
Meio MEM ^a	10 g/l
Meio Schneider ^b	5%
Lactoalbumina ^c	1 g/l
Glicose ^c	1 g/l
Hipoxantina ^c	0,5 µM
Hidrocortisona ^c	1 µM
Serotonina ^c	1 µM
Triiodotironina ^c	0,2 µM
HEPES ^c	25 mM
Penicilina ^d	200 U/ml
Estreptomicina ^d	200 µg/ml
Anfotericina B ^d	2 µg/ml
Soro fetal bovino ^d	10%

Meio para cultivo de esquistossômulos, esterilizado por filtração (BASCH, 1981).

^a Meio Mínimo Essencial de Eagle (MEM); pó preparado conforme recomendações do fabricante (Cultilab).

^b Meio em pó preparado conforme recomendações do fabricante (Sigma-Aldrich).

^c Sigma-Aldrich.

^d Cultilab.

4.6 Avaliação da atividade de compostos e extratos em adultos e esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*

4.6.1 Avaliação da atividade de compostos e extratos em vermes adultos

As culturas de vermes adultos foram continuamente monitoradas por microscopia ou lupa. Para avaliar a toxicidade dos compostos e extratos sobre o *S. mansoni* foram considerados os seguintes parâmetros: atividade motora (motilidade), contração muscular, alterações morfológicas no tegumento e a capacidade reprodutiva.

A redução da atividade motora e as alterações morfológicas foram qualitativamente avaliadas como "leve" ou "significativa". No primeiro caso, utilizou-se um estereomicroscópio, enquanto que, no segundo, um microscópio invertido, usando técnica de campo claro ou contraste de interferência (XIAO e CATTO, 1989; XIAO et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2009, 2010; PARREIRA et al., 2010; MORAES et al., 2011a, 2011b).

A capacidade reprodutiva de *S. mansoni* foi avaliada pelo acasalamento e oviposição das fêmeas. Nos ensaios, o número de ovos era contado diariamente com o auxílio de um estereomicroscópio (SANDERSON et al., 2002; MITSUI; MIURA; AOKI, 2009; BRAGUINE et al., 2009; MORAES et al., 2011a, 2011b).

A mortalidade dos vermes foi julgada pela ausência de movimentos durante 2 minutos ou quando tocados com uma pinça (XIAO e CATTO, 1989; RAMIREZ et al., 2007; KEISER, 2010). No término do período de incubação (5 dias) ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados e analisados em microscopia confocal como descrito no item 3.6.

4.6.2 Avaliação da atividade de compostos e extratos em esquistossômulos

As culturas contendo esquistossômulos, de diferentes idades, em presença de compostos e extratos foram diariamente monitoradas em microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência (RAMIREZ et al., 2007; ABDULLA et al., 2009; KEISER, 2010). A mortalidade dos esquistossômulos de *S. mansoni* foi julgada pela ausência de movimentos durante 2 minutos (XIAO et al., 2007; XIAO; MEI; JIAO, 2009). A viabilidade dos parasitas também foi avaliada com a adição de azul de tripan 0,2% (v/v) às culturas (corante Sigma-Aldrich); nesse caso, após 5 minutos os helmintos foram analisados e os que não incorporaram o corante eram considerados viáveis (HARROP e WILSON, 1993; TALLIMA e EL RIDI, 2008). No término do período de incubação (5 dias após adição do composto ou extrato) ou ocorrência de morte, os helmintos foram fixados e analisados em microscopia confocal como descrito no item 4.6.

4.7 Análise morfológica no tegumento de adultos e esquistossômulos com microscopia confocal

O efeito dos compostos e extratos no tegumento de adultos e esquistossômulos de *S. mansoni* foi monitorado com microscópio confocal de varredura a laser (Laser Scanning Microscopy, LSM 510 META, Carl Zeiss Inc, Standort Göttingen, Vertrieb, Deutschland). Os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados, com captura de imagens, no microscópio usando os filtros de 488 nm (excitação) e 505 nm (emissão) como descrito por Moraes et al. (2009, 2011a, 2011b). A solução AFA consiste em uma mistura de ácido acético glacial, formaldeído, etanol (95%) e água destilada nas proporções, respectivamente (v/v): [2:9:30:59].

Durante a análise microscópica foram capturadas imagens tridimensionais usando o software LSM Image Browser (Zeiss). Os efeitos dos compostos e extratos no tegumento de adultos de *S. mansoni* foram analisados de forma quantitativa. Neste caso, os tubérculos na superfície dorsal de helmintos machos foram contados em uma área de 20.000 μm^2 utilizando o mesmo software de captura de imagem (Figura 6). Pelo menos três áreas distintas do mesmo parasita foram analisadas e quantificadas (MORAES et al., 2011a, 2011b).

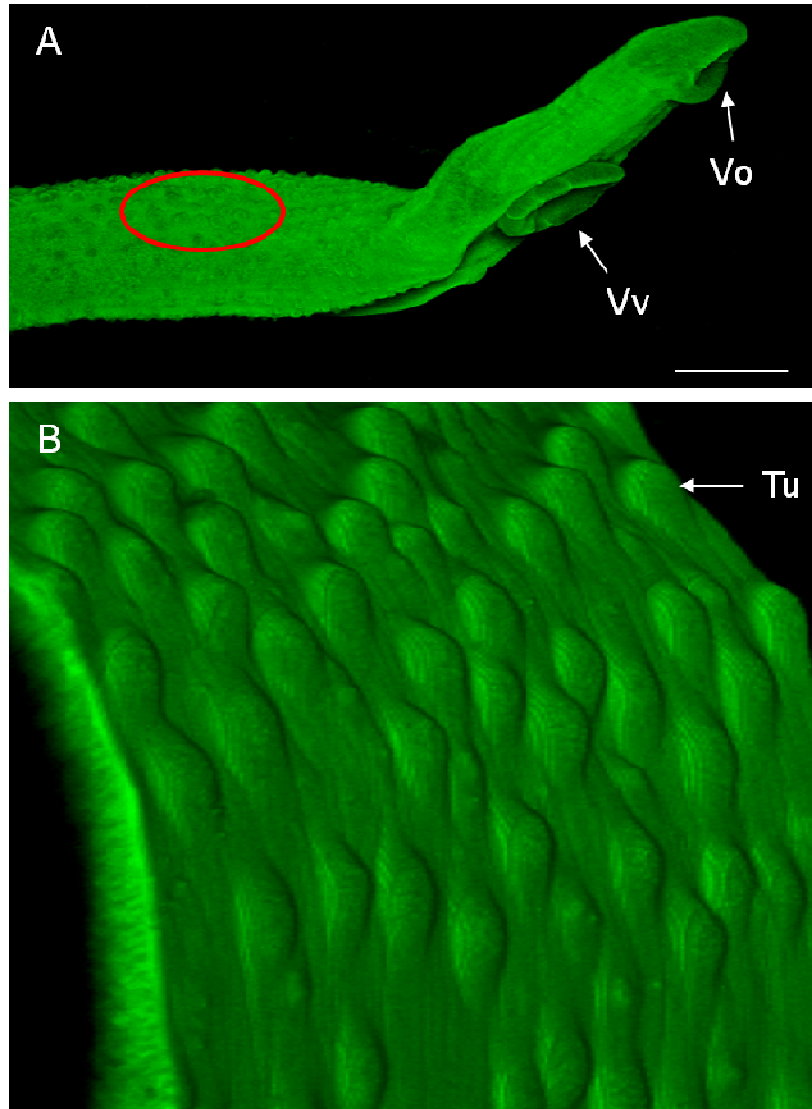


Figura 6. **Região dorsal de um macho de *Schistosoma mansoni*, onde é avaliado, quantitativamente, o efeito de compostos e extratos sobre o tegumento.** O parasita mantido em meio RPMI foi fixado em solução AFA após 120 horas. **A:** visão geral da região anterior do helminto mostrando, em vermelho, o local que é feita a contagem dos tubérculos. Barra = 500 μm . **B:** Área de 20.000 μm^2 , calculada com o software LSM Image Browser (Zeiss), mostrando os tubérculos; imagem aumentada da região dorsal que está marcada em vermelho na imagem A. A e B: imagens tridimensionais, obtidas de microscópio confocal de varredura a laser (LSM 510, META, Zeiss). Em A notar a presença das ventosas oral (Vo) e ventral (Vv). Em B notar os tubérculos (Tu).

4.8 Cultura de células e ensaios de citotoxicidade

4.8.1 Linhagem celular e condições de cultivo

A linhagem de células de mamífero utilizada nos experimentos realizados neste trabalho foi a de células Vero ATCC CCL-81, procedentes do "American Type Culture Collection" (Manassas, VA, USA), uma linhagem celular de rim de macaco verde africano

Cercopithecus aethiops (L.). As células foram gentilmente cedidas, na passagem 161, pelo prof. Dr. Ronaldo Z. Mendonça (Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan).

As células Vero foram mantidas a 37 °C, em atmosfera de CO₂ a 5%, com repiques realizados a intervalos de 3 a 4 cinco dias, em garrafas plásticas para cultura de células (área de 75 cm²), contendo Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM, adquirido na forma líquida pronta para uso; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino. O crescimento era monitorado em microscópio invertido até a formação de monocamadas semiconfluentes, assegurando-se, assim, a obtenção de células em fase logarítmica de crescimento. Por serem células aderentes, para a obtenção de suspensão, o sobrenadante das culturas era colhido e as células aderidas eram descoladas em solução tripsina/EDTA 0,05% (Gibco), procedimento este feito a 37 °C (tempo aproximado, cinco minutos). A suspensão celular era transferida para tubos de polipropileno de fundo cônico (capacidade de 50 ml); após centrifugação a 400 x g, por 10 minutos à temperatura ambiente, as células eram ressuspensas em meio DMEM, contadas em câmara de Neubauer e então utilizadas em novos repiques ou distribuídas em microplacas de 96 poços (Nalge Nunc International, Rochester, NY, USA) para os ensaios de citotoxicidade.

4.8.2 Ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram feitos utilizando o método de coloração por cristal violeta, como descrito por Cruz, Mendonça e Petricevich (2005). Nos experimentos, as células Vero, nas passagens 162 a 171, foram crescidas em placas de cultura de 96 poços (inoculo inicial de 1 x 10⁵/ml). Após 24 horas, com tapetes celulares confluentes, o meio foi removido por aspiração e, em seguida, foi adicionado 200 µl de meio DMEM contendo diferentes concentrações de compostos ou extratos em DMSO 0,2%. A incubação prosseguia a 37 °C (em atmosfera de CO₂ a 5%) e, após diferentes tempos, os sobrenadantes eram retirados e as células aderidas foram fixadas e coradas com a adição de 50 µl de uma solução que continha cristal violeta 0,2% em metanol 20% (v/v). Após cerca de 10 minutos, o corante foi removido por sucessivas lavagens em água destilada e as microplacas secas à temperatura ambiente.

As células viáveis ficam aderidas nas placas e, portanto, são coradas pelo cristal violeta. Para uma análise mais detalhada da citotoxicidade, adicionou-se 100 µl de etanol 99% nas microplacas e a eventual toxicidade era avaliada a partir da absorbância de poços controles, contendo células em meio DMEM com DMSO 0,2%. As absorbâncias foram lidas a 595 nm em leitor de microplaca (modelo iEMS, Labsystems, Vienna, VA, USA).

4.9 Análises gráficas e estatísticas

Os tratamentos gráficos e análises estatísticas foram realizados com os programas GraphPad Prism versão 5.0 e Excel versão 2007 (Microsoft). As estruturas químicas dos compostos foram feitas com o programa ChemDraw versão Ultra 12.0, cujo software foi gentilmente cedido pela Ms. Leiz M. C. Miura (Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, *Campus* Ministro Reis Velloso, UFPI). A característica anfifílica do peptídeo antimicrobiano dermaseptina foi representada pela projeção Helix-Wheel, um aplicativo Java criado por Edward K. O'Neil e Charles M. Grisham (University of Virginia in Charlottesville, Virginia, EUA). Todas as figuras estão no formato "Tagged Image File" (TIF), com 200 DPI a 300 DPI (pontos por polegada), para melhor resolução no processo de impressão.

A comparação entre os conjuntos experimentais foi feita por análise de variância (ANOVA, "one-way"), aplicando-se o teste de Tukey. Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas quando a probabilidade de igualdade foi menor que 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Viabilidade de adultos de *Schistosoma mansonii* em presença de compostos e extratos

A viabilidade dos adultos de *Schistosoma mansoni* foi monitorada, diariamente, utilizando microscópio invertido e estereomicroscópio. Os parâmetros avaliados nesta parte do trabalho foram: a) taxa de mortalidade; b) atividade motora (motilidade). Nos experimentos, os pares de helmintos adultos foram incubados, in vitro, durante cinco dias em placas de 24 poços contendo compostos ou extratos em meio RPMI suplementado com 10% de soro a 37 °C, em atmosfera de CO₂ a 5%. Os compostos (piplartina, piperina, grandisina, epiisopiloturina e dermaseptina) e os extratos etanólicos (*Piper tuberculatum*, *Piper crassinervium*, *Piper diospyrifolium*, *Piper fuligineum*, *Piper gaudichaudianum* e *Pothomorphe umbellata*) utilizados foram diluídos em meio RPMI ou em meio contendo DMSO 0,2% (concentração final) e então adicionados às culturas previamente a adição de *S. mansoni*. Poços contendo praziquantel 3 µg/ml ou somente meio RPMI com DMSO 0,2% foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente.

5.1.1 Alterações na viabilidade de adultos de *Schistosoma mansoni* em presença de compostos e extratos

Todos os compostos e extratos estudados causaram alterações na viabilidade dos vermes adultos. Os compostos e extratos reduziram a motilidade e causaram a morte dos parasitas de forma diretamente dependente da concentração e do tempo de incubação (Figuras 7-17). O monitoramento dos parasitas mantidos em cultura por 24 horas indicou que o efeito esquistossomicida, em todos os adultos de *S. mansoni*, ocorreu com os compostos piplartina 5 µg/ml, dermaseptina 200 µg/ml, piperina 950 µg/ml e grandisina 2000 µg/ml; e com os extratos de *Piper tuberculatum* 10 µg/ml, *Piper crassinervium* 100 µg/ml, *Piper diospyrifolium* 125 µg/ml, *Piper fuligineum* 150 µg/ml, *Pothomorphe umbellata* 150 µg/ml e *Piper gaudichaudianum* 300 µg/ml. No término do período de incubação, isto é, 120 horas, a mortalidade de 100% foi atingida com os compostos piplartina 3 µg/ml, dermaseptina 50 µg/ml, epiisopiloturina 150 µg/ml, piperina 300 µg/ml e grandisina 900 µg/ml; e com os extratos de *Piper tuberculatum* 4 µg/ml, *Piper crassinervium* 50 µg/ml, *Piper diospyrifolium* 50 µg/ml, *Piper fuligineum* 50 µg/ml, *Pothomorphe umbellata* 40 µg/ml e *Piper gaudichaudianum* 75 µg/ml (Figuras 7-17).

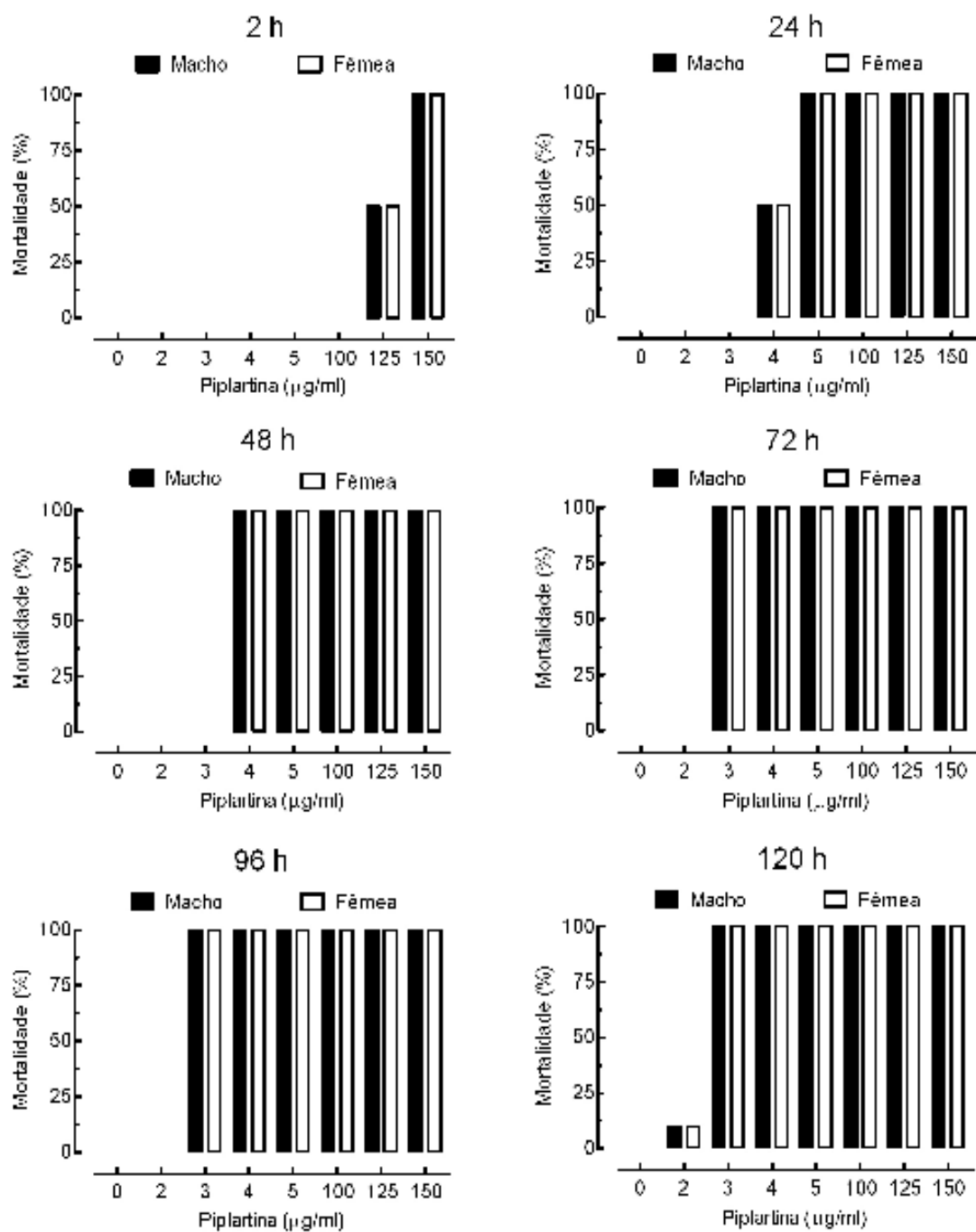


Figura 7. **Efeito da amida piplartina na sobrevivência de adultos de *Schistosoma mansoni*.**

Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo diferentes concentrações de piplartina. Os parasitas foram monitorados nos tempos indicados. Os valores são média de 10 casais de vermes no total de três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

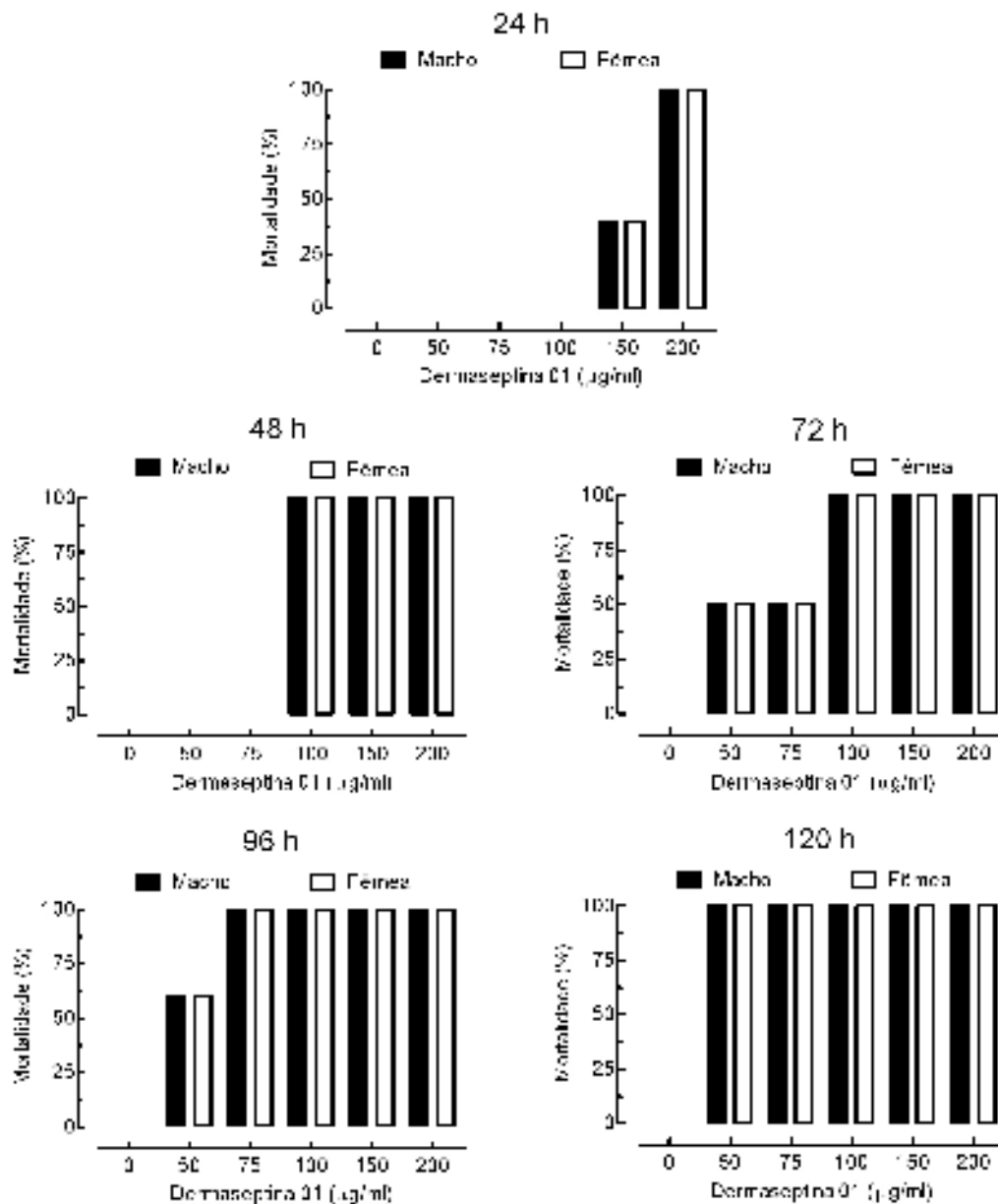


Figura 8. **Efeito do peptídeo dermaseptina 01 na sobrevivência de adultos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo diferentes concentrações de dermaseptina. Os parasitas foram monitorados nos tempos indicados. Os valores são média de 10 casais de vermes no total de três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

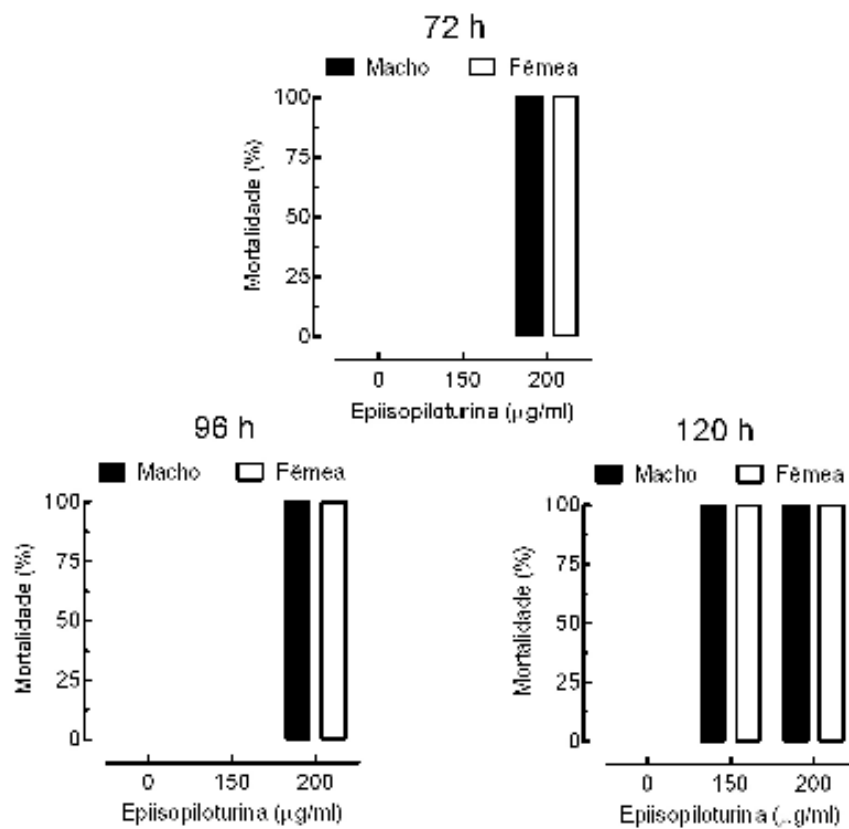


Figura 9. **Efeito do alcaloide epiisopiloturina na sobrevivência de adultos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo diferentes concentrações de epiisopiloturina. Os parasitas foram monitorados nos tempos indicados. Os valores são média de 9 casais de vermes no total de três experimentos feitos em triplicatas.

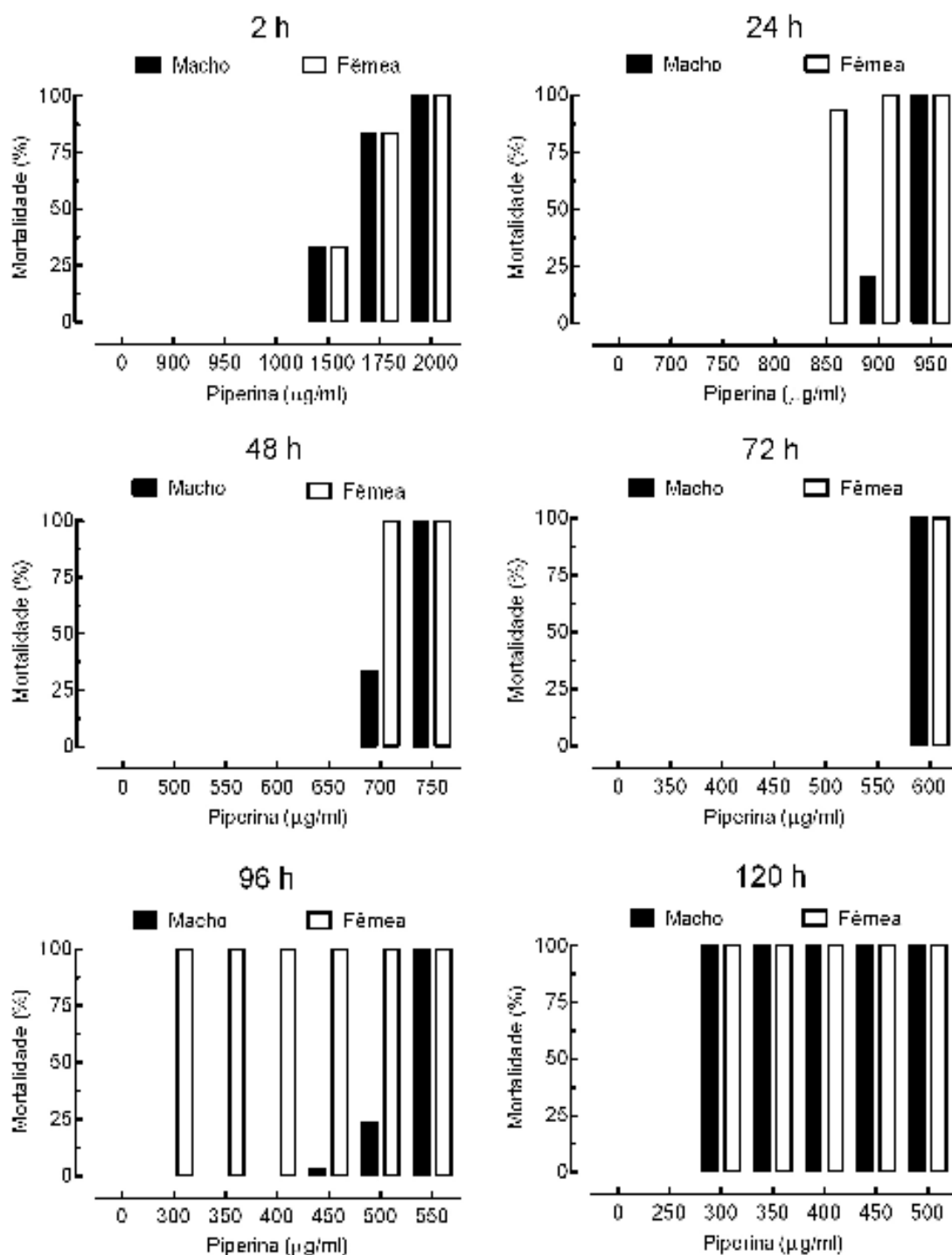


Figura 10. **Efeito da amida piperina na sobrevivência de adultos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo diferentes concentrações de piperina. Os parasitas foram monitorados nos tempos indicados. Os valores são média de 12 a 15 casais de vermes no total de, pelo menos, três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

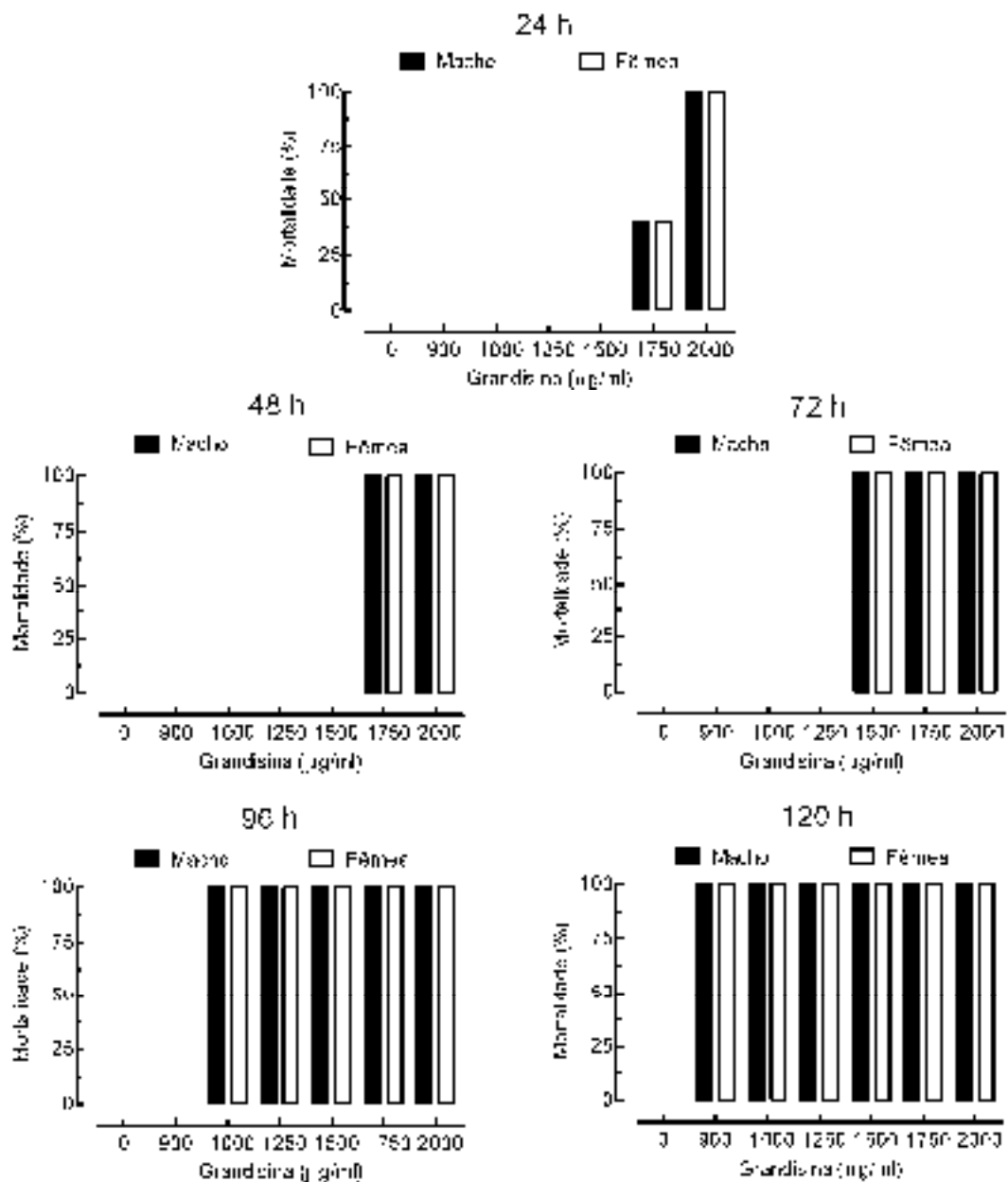


Figura 11. **Efeito da lignana grandisina na sobrevivência de adultos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo diferentes concentrações de grandisina. Os parasitas foram monitorados nos tempos indicados. Os valores são média de 10 casais de vermes no total de três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

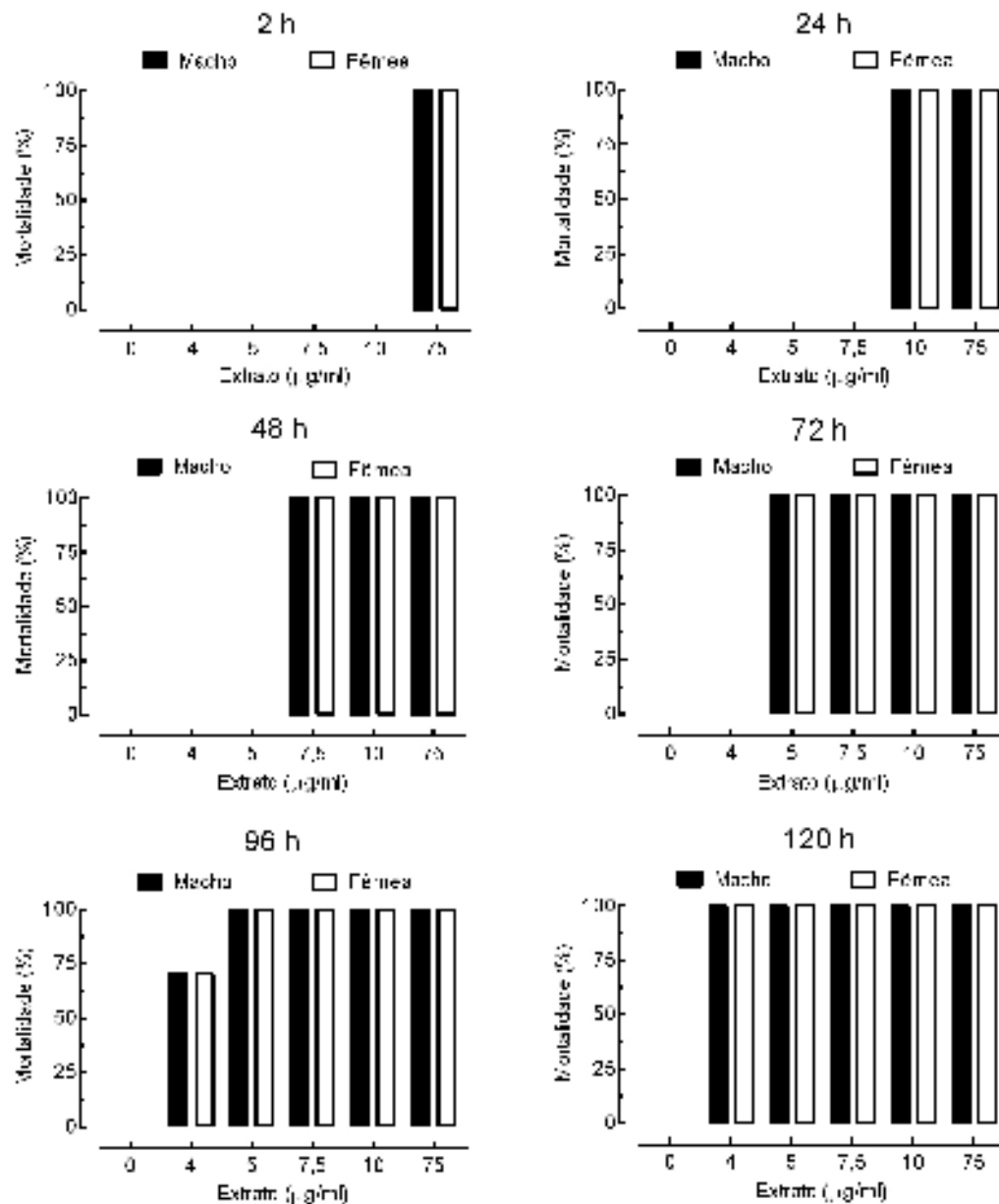


Figura 12. **Efeito do extrato de *Piper tuberculatum* na sobrevivência de adultos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo diferentes concentrações do extrato de *P. tuberculatum*. Os parasitas foram monitorados nos tempos indicados. Os valores são média de 10 casais de vermes no total de três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

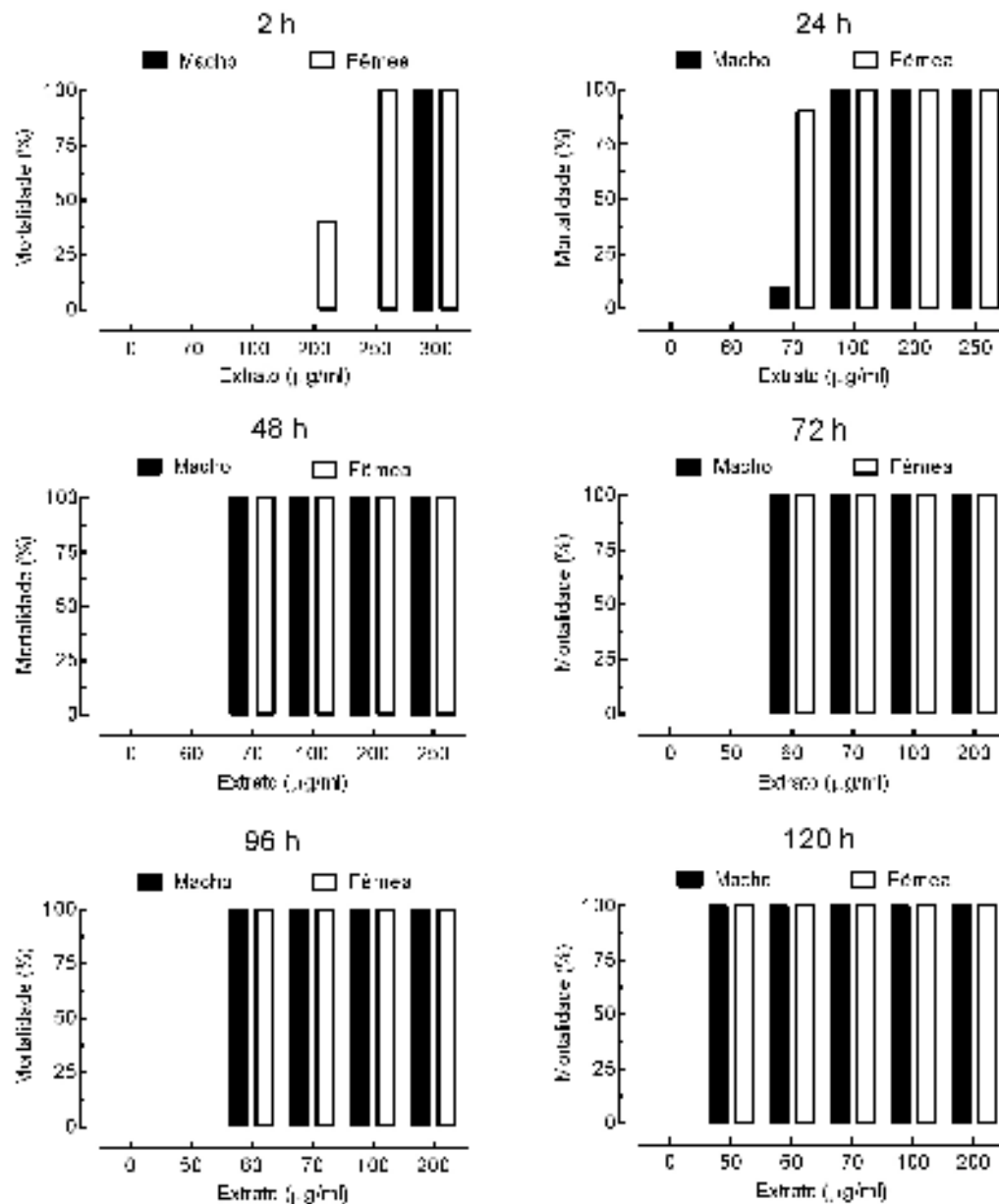


Figura 13. **Efeito do extrato de *Piper crassinervium* na sobrevivência de adultos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo diferentes concentrações do extrato de *P. crassinervium*. Os parasitas foram monitorados nos tempos indicados. Os valores são média de 10 casais de vermes no total de três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

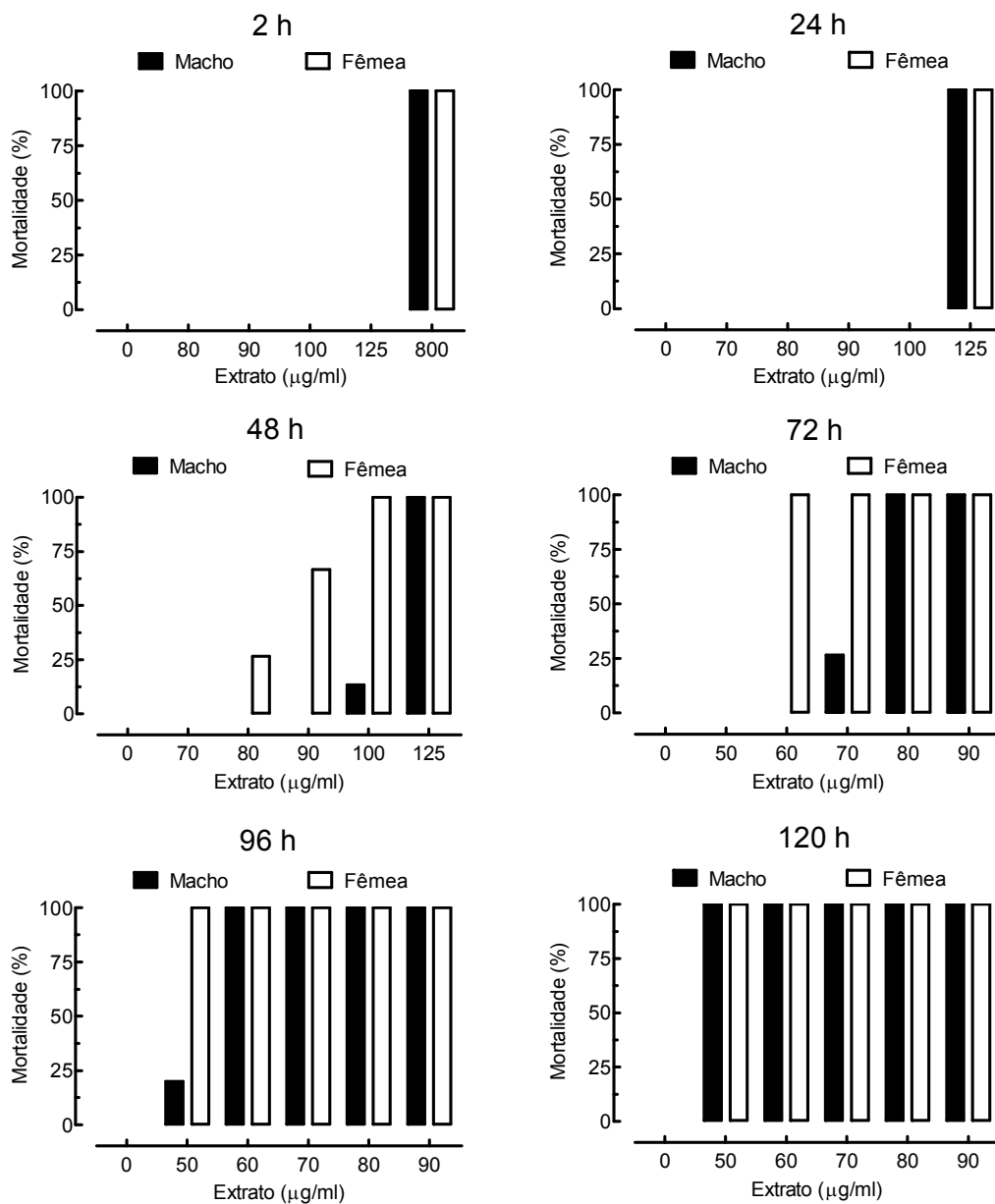


Figura 14. **Efeito do extrato de *Piper diospyrifolium* na sobrevivência de adultos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo diferentes concentrações do extrato de *P. diospyrifolium*. Os parasitas foram monitorados nos tempos indicados. Os valores são média de 12 a 15 casais de vermes no total de, pelo menos, três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

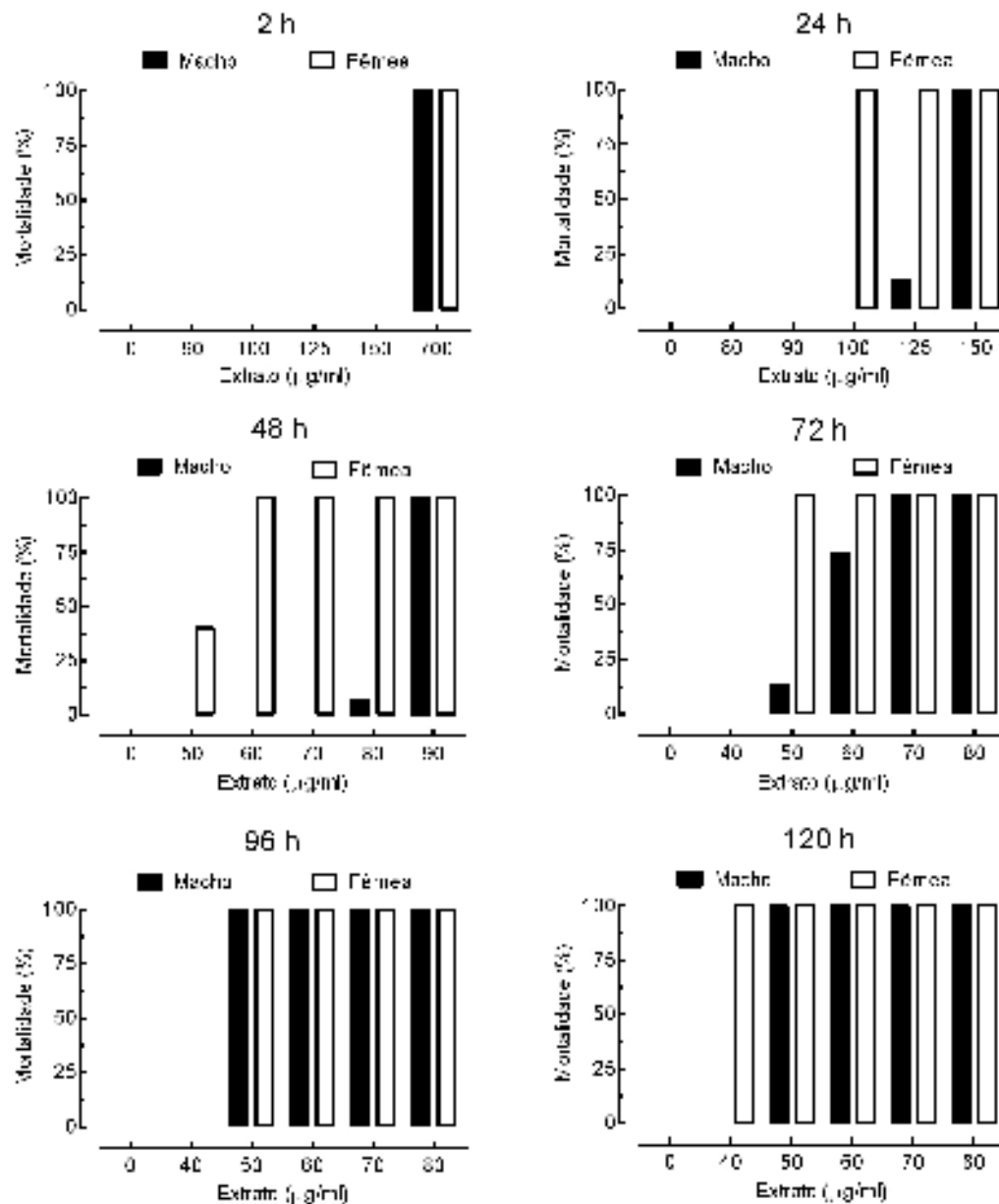


Figura 15. **Efeito do extrato de *Piper fuliginum* na sobrevivência de adultos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo diferentes concentrações do extrato de *P. fuliginum*. Os parasitas foram monitorados nos tempos indicados. Os valores são média de 12 a 15 casais de vermes no total de, pelo menos, três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

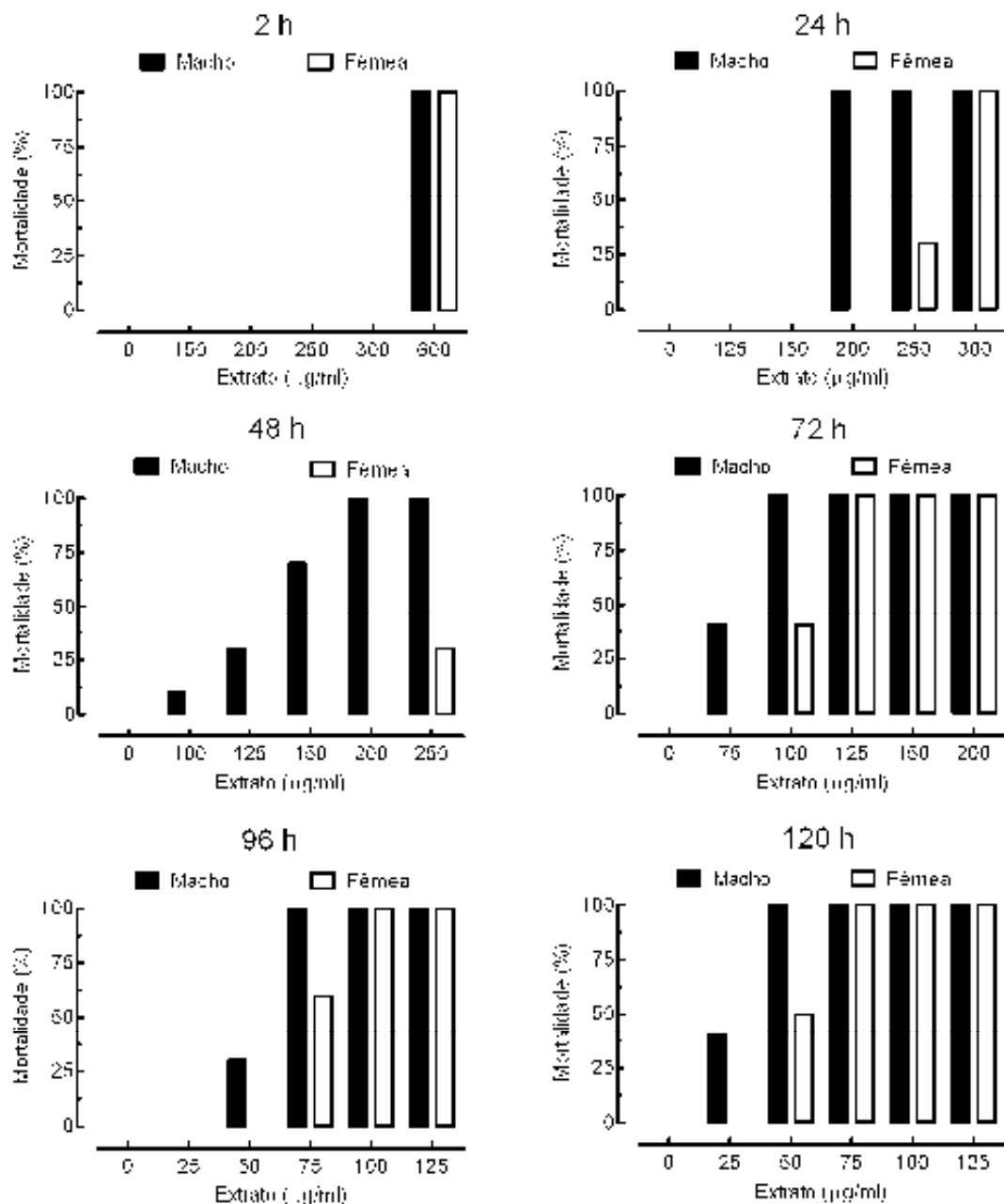


Figura 16. **Efeito do extrato de *Piper gaudichaudianum* na sobrevivência de adultos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo diferentes concentrações do extrato de *P. gaudichaudianum*. Os parasitas foram monitorados nos tempos indicados. Os valores são média de 10 casais de vermes no total de três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

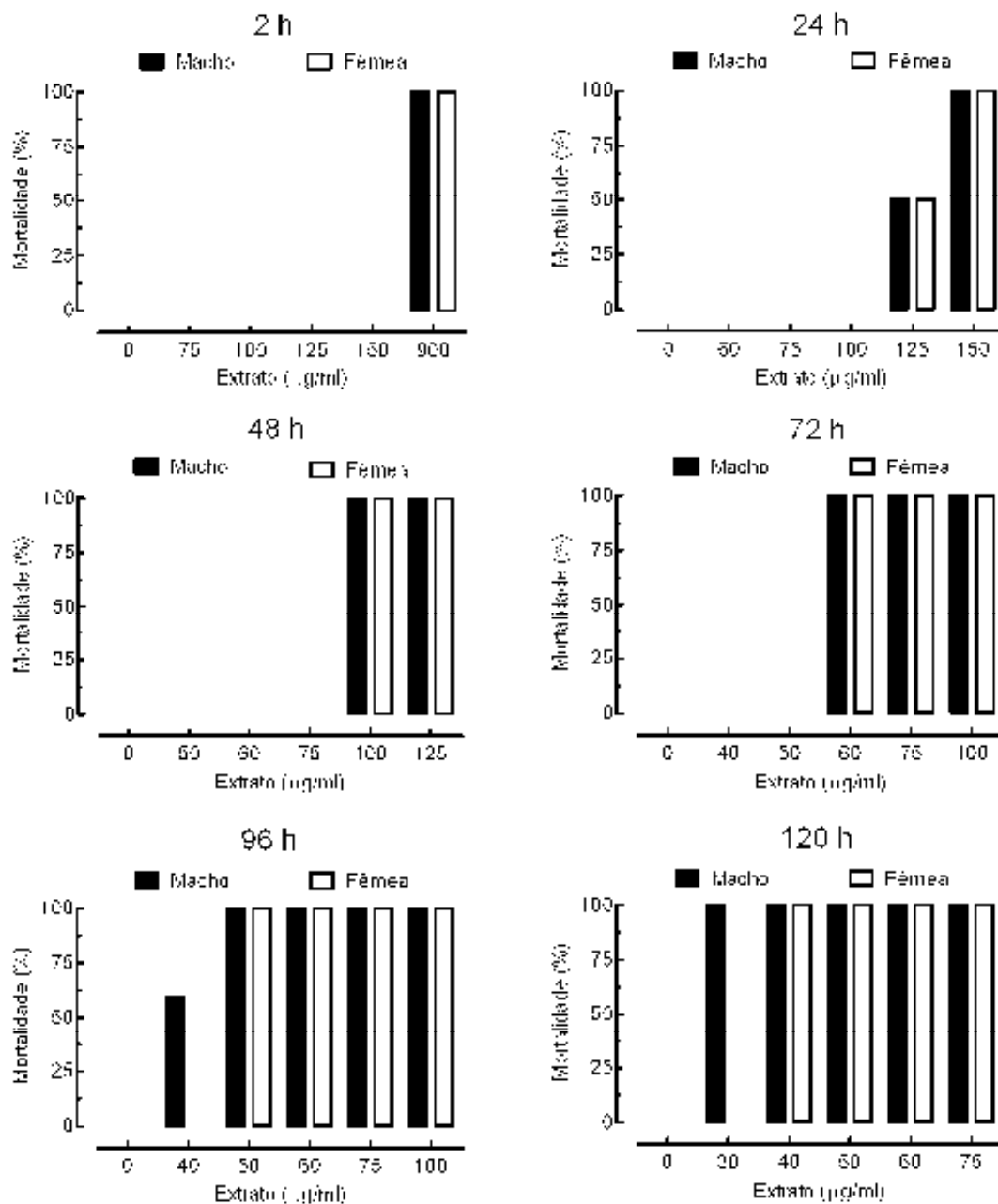


Figura 17. **Efeito do extrato de *Pothomorphe umbellata* na sobrevivência de adultos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo diferentes concentrações do extrato de *P. umbellata*. Os parasitas foram monitorados nos tempos indicados. Os valores são média de 10 casais de vermes no total de três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

As diferenças na susceptibilidade entre macho e fêmeas de *Schistosoma* não foram suficientemente investigadas e poucos trabalhos abordam a susceptibilidade ou resistência dos pares de vermes adultos em presença de compostos ou extratos esquistossomicidas. Entre eles, por exemplo, Sanderson et al. (2002) relataram que os helmintos machos são mais susceptíveis que as fêmeas quando em presença de extratos de rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae), um vegetal popularmente conhecido como gengibre ou mangaratá. Além disso, Liang et al. (2001) e Pica-Mattoccia e Ciolli (2004) também mostraram maior mortalidade em parasitas machos durante os estudos com espécimes resistentes e susceptíveis ao praziquantel. Por outro lado, De Araújo et al. (2007) e De Oliveira Penido et al. (2009) assinalaram que os vermes fêmeas são mais susceptíveis que os machos nos experimentos com ácidos N-alquilamino-alcano-tiosulfúricos. Mitsui et al. (2009) também relatam que as fêmeas são mais susceptíveis ao tratamento com artenusato.

Como mostrado nas Figuras 7-17, nos experimentos realizados no presente estudo, notam-se, em alguns casos, diferenças nas taxas de mortalidade entre machos e fêmeas de *S. mansoni*. As fêmeas são mais susceptíveis a piperina e aos extratos de *Piper crassinervium*, *Piper diospyrifolium* e *Piper fuligineum*; enquanto que os helmintos machos são mais susceptíveis aos extratos de *Piper gaudichaudianum* e *Pothomorphe umbellata*. Por outro lado, não houve diferença na taxa de mortalidade entre machos e fêmeas em presença de piplartina, dermaseptina, epiisopiloturina, grandisina e o extrato de *Piper tuberculatum*.

No geral, considerando as concentrações dos 6 extratos e 5 compostos naturais ensaiados, a análise dos experimentos indicou que os adultos de *Schistosoma mansoni* são mais susceptíveis a piplartina, dermaseptina e os extratos etanólicos obtidos de folhas de *Piper tuberculatum* e *Pothomorphe umbellata*. As concentrações mínimas dos compostos e extratos capazes de matar 100% dos parasitas estão listadas na Tabela 6.

Tabela 6 - **Concentração mínima de compostos e extratos capaz de causar efeito esquistossomicida em 100% dos adultos de *Schistosoma mansoni***

Compostos/Extratos ^a	Concentração mínima capaz de matar 100% dos parasitas			
	Machos		Fêmeas	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM
Piplartina	3	9,45	3	9,45
Dermaseptina 01	50	17,89	50	17,89
Epiisopiloturina	150	524,47	150	524,47
Piperina	300	1.051,45	300	1.051,45
Grandisina	900	2.080,89	900	2.080,89
<i>Piper tuberculatum</i>	4	--	4	--
<i>Pothomorphe umbellata</i>	30	--	40	--
<i>Piper fuligineum</i>	50	--	40	--
<i>Piper crassinervium</i>	50	--	50	--
<i>Piper diospyrifolium</i>	50	--	50	--
<i>Piper gaudichaudianum</i>	50	--	75	--
PZQ ^b	3	9,60	3	9,60

Os pares de adultos de *S. mansoni* foram incubados no meio RPMI contendo diferentes concentrações de extratos ou compostos. Os parasitas foram monitorados diariamente por até 5 dias.

^a Em DMSO 0,2% no meio RPMI; exceção ao peptídeo dermaseptina 01 no qual foi dissolvido direto no meio RPMI.

^b Controle positivo: Praziquantel (PZQ).

Os valores correspondem a, pelo menos, três experimentos independentes feitos em triplicatas.

Em todos os ensaios para avaliar a toxicidade de compostos e extratos em *S. mansoni*, a concentração final do DMSO foi 0,2% (v/v). A concentração de DMSO empregada na maioria dos estudos in vitro é entre 0,2% e 2% (PICA-MATTOCCIA e Cioli, 2004; RAMIREZ et al., 2007; ABDULLA et al., 2009; XIAO et al., 2009; MANNECK et al., 2010). Entretanto, alguns estudos in vitro utilizam concentrações altas de DMSO como, por exemplo, 10% (BRAGUINE et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009, 2010; PARREIRA et al., 2010). No presente estudo, em todos os experimentos foram realizados dois controles simultaneamente: um com DMSO 0,2% e, outro, sem o solvente. Em todos os casos, não houve diferenças entre os grupos tratados ou não com DMSO 0,2%, evidenciando que a concentração do solvente usada neste estudo não afeta a viabilidade dos parasitas. Cabe salientar, ainda, que essas considerações em relação ao uso do DMSO servem para todos os experimentos feitos com adultos e esquistossômulos de *S. mansoni*, cujos resultados serão mostrados adiante.

5.1.2 Efeito de compostos e extratos na atividade motora e no acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*

Os esquistosomas adultos, principalmente os machos, apresentam uma variedade de movimento entre os quais, rápidos encurtamento e prolongamento do corpo, movimentos ondulatórios e ondas peristálticas ao longo do corpo, parcial ou de uma extremidade a outra (DA SILVA e NOEL, 1995). A motilidade do parasita, e o efeito de substâncias sobre essa atividade, baseiam-se, principalmente, na observação visual. A análise macroscópica da atividade motora apresenta a vantagem de ser um método simples, direto, de baixo custo e facilidade operacional (NOËL, 2008).

No presente estudo, a atividade motora de *S. mansoni*, baseada na observação macroscópica e microscópica dos vermes, foi diariamente monitorada e qualitativamente definida como "leve" ou "significativa". Apesar de subjetivo, esse critério qualitativo é comumente empregado nos ensaios in vitro (XIAO et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2009, 2010; PARREIRA et al., 2010; MORAES et al., 2011a, 2011b). Nos experimentos realizados neste estudo, comparativamente aos helmintos incubados apenas em meio de cultura, a motilidade dos parasitas foi significativamente reduzida com piplartina 2 µg/ml, dermaseptina 50 µg/ml, epiisopiloturina 75 µg/ml piperina 300 µg/ml e grandisina 900 µg/ml; e com os extratos de *Piper tuberculatum* 4 µg/ml, *Piper crassinervium* 50 µg/ml, *Piper diospyrifolium* 50 µg/ml, *Piper fuligineum* 40 µg/ml e *Piper gaudichaudianum* 25 µg/ml e *Pothomorphe umbellata* 40 µg/ml. Nas concentrações letais, independentemente do tempo de incubação, notou-se, ainda, que nenhum composto ou extrato induziu contração muscular nos parasitas. Por outro lado, praziquantel 3 µg/ml induziu, nos instantes iniciais, contração dos helmintos e redução na motilidade sem a separação dos pares de adultos de *S. mansoni* (Tabelas 7-17).

Tabela 7 - Efeito da amida piplartina na atividade motora e no acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*

Piplartina ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0
2	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	10,0	0,0	0,0	10,0
3	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	100,0	30,0	0,0
	48	0,0	100,0	60,0	30,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
4	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	50,0	100,0	20,0	60,0
	48	100,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
5	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	100,0	100,0	0,0	100,0
	48	100,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
150	2	100,0	100,0	0,0	100,0
	24	100,0	100,0	0,0	100,0
	48	100,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
PZQ^{b,c}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 8 - Efeito do peptídeo dermaseptina 01 na atividade motora e no acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*

Dermaseptina ($\mu\text{g/ml}$)	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0
50	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	50,0	0,0
	72	50,0	0,0	50,0	50,0
	96	60,0	0,0	40,0	60,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
75	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	50,0	0,0
	72	50,0	0,0	50,0	70,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
100	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	60,0	40,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
150	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	40,0	0,0	50,0	50,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
200	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
PZQ^b	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes.

^b Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente. Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 9 - Efeito do alcaloide epiisopiloturina na atividade motora e no acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*

Epiisopiloturina ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0
75	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	22,2	11,1
100	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	22,2	0,0
	96	0,0	0,0	33,3	16,6
	120	0,0	0,0	55,5	44,4
150	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	33,3	22,2
	72	0,0	0,0	66,6	33,3
	96	0,0	0,0	22,2	77,7
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
200	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	44,4	0,0
	48	0,0	0,0	44,4	55,5
	72	100,0	11,1	0,0	100,0
	96	100,0	11,1	0,0	100,0
	120	100,0	11,1	0,0	100,0
PZQ^{b,c}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 18 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente. Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Tabela 10 - Efeito da amida piperina na atividade motora e no acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*

Piperina ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0
300	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	20,0	0,0
	96	50,0	100,0	26,6	73,3
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
400	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	26,6	13,3
	96	50,0	100,0	13,3	86,6
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
600	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	20,0	0,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
700	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	66,6	100,0	6,66	93,3
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
950	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	100,0	100,0	0,0	100,0
	48	100,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
PZQ^{b,c}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 30 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a quatro experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 11 - Efeito da lignana grandisina na atividade motora e no acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*

Grandisina ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0
900	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	60,0	0,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
1000	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
1250	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	40,0	20,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
1500	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	40,0	60,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
2000	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
PZQ^{b,c}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 12 - Efeito do extrato de *Piper tuberculatum* na atividade motora e no acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0
4	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	70,0	100,0	30,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
5	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
7,5	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
10	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	100,0	100,0	0,0	100,0
	48	100,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
75	2	100,0	100,0	0,0	100,0
	24	100,0	100,0	0,0	100,0
	48	100,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
PZQ^{b,c}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Tabela 13 - Efeito do extrato de *Piper crassinervium* na atividade motora e no acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0
50	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	40,0	10,0
	72	0,0	0,0	30,0	70,0
	96	0,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
60	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
70	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	50,0	100,0	0,0	80,0
	48	100,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
100	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	100,0	100,0	0,0	100,0
	48	100,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
300	2	100,0	100,0	0,0	100,0
	24	100,0	100,0	0,0	100,0
	48	100,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
PZQ^{b,c}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 14 - Efeito do extrato de *Piper diospyrifolium* na atividade motora e no acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0
50	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	100,0	36,6	0,0
	96	60,0	100,0	16,6	83,3
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
60	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	100,0	0,0	0,0
	72	50,0	100,0	40,0	60,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
70	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	100,0	6,6	0,0
	72	63,3	100,0	16,6	83,3
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
80	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	100,0	0,0	0,0
	48	13,3	100,0	0,0	0,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
800	2	100,0	100,0	0,0	100,0
	24	100,0	100,0	0,0	100,0
	48	100,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
PZQ^{b,c}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 30 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a quatro experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 15 - Efeito do extrato de *Piper fuliginum* na atividade motora e no acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0
40	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	50,0	100,0	16,6	50,0
50	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	46,6	10,0
	48	20,0	100,0	0,0	100,0
	72	56,6	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
70	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	53,3	20,0
	48	50,0	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
80	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	60,0	20,0
	48	53,3	100,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
700	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
PZQ^{b,c}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 30 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a quatro experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 16 - Efeito do extrato de *Piper gaudichaudianum* na atividade motora e no acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*

Extrato (µg/ml) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0
25	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	0,0
	96	0,0	0,0	80,0	20,0
	120	20,0	100,0	0,0	100,0
50	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	50,0	5,0
	96	15,0	100,0	0,0	100,0
	120	75,0	100,0	0,0	100,0
75	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	20,0	100,0	15,0	50,0
	96	80,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
100	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	5,0	60,0	20,0	30,0
	72	70,0	100,0	0,0	100,0
	96	100,0	100,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	0,0	100,0
600	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
PZQ^{b,c}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 µg/ml).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 17 - Efeito do extrato de *Pothomorphe umbellata* na atividade motora e no acasalamento de adultos de *Schistosoma mansoni*

Extrato (µg/ml) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Vermes separados (%) ^a	Redução na atividade motora (%) ^a	
				Leve	Significativa
0	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0
40	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	30,0	0,0	10,0	30,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
50	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	40,0	20,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
100	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	20,0	0,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
150	2	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
900	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0
PZQ^{b,c}	2	100,0	0,0	0,0	100,0
	24	100,0	0,0	0,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 20 vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 µg/ml).

A atividade motora foi monitorada em estereomicroscópio e avaliada qualitativamente.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Em *Schistosoma mansoni*, o controle da motilidade está associado a importantes neurotransmissores ou neuromoduladores, tais como serotonina, dopamina, acetilcolina, adrenalina, noradrenalina, neuropeptídeos relacionados a FMRF-amidas (FaRPs), γ -ácido aminobutírico (GABA) e glutamato (PAX e BENNETT, 1991; SANGSTER et al., 2005; NOËL et al., 2008; MARKS e MAULE, 2010; TAMAN e RIBEIRO, 2009, 2011). Desta forma, os neurotransmissores são possíveis alvos de agentes esquistossomicidas, sobretudo depois de ter sido mostrado que agonistas e/ou antagonistas desses sistemas produziram alterações do padrão de atividade motora do verme (SANGSTER et al., 2005; NOËL et al., 2008). Sugere-se que alguns compostos esquistossomicidas como, por exemplo, oxamniquina, metrifonato, hancantona, lucantona e imidazolidinas causam alterações na motilidade dos parasitas por atuarem em receptores de acetilcolina (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1995; DUBOIS et al., 2009; NEVES et al., 2010). Assim, levando em consideração os dados já assinalados na literatura, é possível que as alterações na atividade motora de adultos de *S. mansoni* em presença de compostos ou extratos estejam associadas à neurotransmissores ou neuromoduladores.

As observações efetuadas nas culturas de *S. mansoni* revelaram outro aspecto interessante do comportamento dos parasitas adultos. Nas concentrações letais dos compostos e extratos houve a separação dos casais de vermes antes da ação helminticida, mais notadamente com os compostos piplartina e piperina, bem como os extratos de *Piper tuberculatum*, *Piper crassinervium*, *Piper diospyrifolium*, *Piper fuliginum* e *Piper gaudichaudianum* (Tabelas 7, 10, 12-16). Entretanto, os compostos dermaseptina e grandisina e o extrato das folhas de *Pothomorphe umbellata* não induziram a separação dos parasitas, independentemente da concentração, durante todo o período de incubação (Tabelas 8, 11 e 17).

Corroborando os nossos resultados, o pareamento dos adultos de *S. mansoni* em presença de compostos ou extratos esquistossomicidas foi assinalado recentemente em alguns estudos in vitro. Por exemplo, Parreira et al. (2010) mostraram que o óleo essencial extraído de folhas de *Baccharis dracunculifolia* não causa a separação dos parasitas na concentração de 10 $\mu\text{g/ml}$; no entanto, os vermes não se mantiveram acasalados quando a concentração do óleo essencial é aumentada para 50 $\mu\text{g/ml}$. Magalhães et al. (2010) mostraram, em experimentos com floroglucínóis obtidos do rizoma de samambaias do gênero *Dryopteris*, que aspidina e ácido flavaspídico (ambos com 10 μM e 100 μM) causam a separação dos casais, enquanto a desaspidina (10 μM a 100 μM) possui efeito letal sem interferir no pareamento dos helmintos; além disso, os mesmos autores relatam que o composto aspidinol entre 10 μM e 50 μM não afeta os pares de vermes, mas na concentração de 100 μM separa todos os parasitas. A separação dos casais de *S. mansoni* previamente a ação helminticida também foi

relatada com curcumina 50 μM e imidazolidinas 160 μM a 140 μM (MAGALHÃES et al., 2010; NEVES et al., 2010).

Em *Schistosoma mansoni* sabe-se que entre o tegumento e as células subtegumentares encontra-se uma região de musculatura lisa, organizada em camadas circulares e longitudinais, com algumas fibras radiais, particularmente no verme macho. A musculatura longitudinal é importante para a motilidade do verme, enquanto que a musculatura circular tem como principal função a manutenção do canal ginecóforo e, portanto, o pareamento do casal de vermes (PAX e BENNETT, 1991; PAX et al., 1996; MAIR et al., 1998, 2000; NOËL et al., 2008). Assim, levando em consideração os dados já assinalados na literatura, é possível que os compostos e extratos tenham afetado a musculatura do parasita, causando a separação dos casais de *Schistosoma*.

5.2 Efeito de compostos e extratos no tegumento de adultos de *Schistosoma mansoni*

O tegumento das espécies de *Schistosoma* é um dos principais alvos quimioterápicos. De fato, os compostos atuais que são utilizados na terapêutica clínica como praziquantel, artemeter e mefloquina causam alterações morfológicas no tegumento dos parasitas (SHUHUA et al., 2000; XIAO et al., 2000b; WILLIAM et al., 2001; DOENHOFF et al., 2008; MANNECK et al., 2010). Além de proteção, o tegumento é especializado para absorção e secreção, e para atuar como sítio das ações imunológicas do hospedeiro (SKELLY e ALAN WILSON, 2006; VAN HELLEMOND et al., 2006; FAGHIRI et al., 2010; KEISER, 2010; XAVIER et al., 2010). O objetivo desta parte do trabalho foi verificar se os compostos e extratos vegetais causam alterações no tegumento de adultos de *Schistosoma mansoni*.

5.2.1 Alterações no tegumento de adultos de *Schistosoma mansoni* em presença de compostos e extratos

O efeito dos compostos e extratos no tegumento dos adultos de *Schistosoma mansoni* foi diariamente monitorado em microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência. Em geral, todos os compostos e extratos estudados causaram danos nos tegumentos dos helmintos, com exceção da lignana grandisina, de forma diretamente dependente da concentração e do tempo de incubação. As alterações morfológicas na superfície dos parasitas foram qualitativamente definidas como "leve" ou "significativa" (Tabelas 18-28).

Considerando os compostos ensaiados, observações morfológicas indicaram alterações tegumentares em vermes machos e fêmeas, respectivamente, quando em presença de piplartina 3 µg/ml e 20 µg/ml e dermaseptina 50 µg/ml e 75 µg/ml; além disso, notou-se dano no tegumento de parasitas machos com epiisopiloturina 150 µg/ml e em ambos os sexos com piperina 600 µg/ml (Tabelas 18-21). Nos extratos vegetais observou-se alteração no tegumento de machos e fêmeas de *S. mansoni*, respectivamente, quando em presença de *Piper tuberculatum* 3 µg/ml e 10 µg/ml, *P. crassinervium* 60 µg/ml e 70 µg/ml, *P. diospyrifolium* 250 µg/ml e 70 µg/ml, *P. fuligineum* 70 µg/ml e 50 µg/ml, *P. gaudichaudianum* 75 µg/ml e 150 µg/ml e *Pothomorphe umbellata* 40 µg/ml e 75 µg/ml (Tabelas 23-28).

Tabela 18 - Alterações tegumentares em adultos de *Schistosoma mansoni* durante incubação com a amida piplartina

Piplartina ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Alterações tegumentares (%) ^a			
			Leve		Significativa	
			Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	60,0	0,0	0,0	0,0
	72	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0
4	24	50,0	100,0	0,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0
	72	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0
5	24	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0
	72	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0
10	24	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0
	72	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0
20	24	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	72	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
30	24	100,0	0,0	50,0	100,0	50,0
	48	100,0	0,0	50,0	100,0	50,0
	72	100,0	0,0	50,0	100,0	50,0
40	24	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
PZQ^{b,c}	24	100,0	30,0	10,0	70,0	90,0

^a Porcentagem em relação a 10 pares de vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

As alterações tegumentares foram avaliadas qualitativamente usando microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 19 - Alterações tegumentares em adultos de *Schistosoma mansoni* durante incubação com o peptídeo dermaseptina 01

Dermaseptina ($\mu\text{g/ml}$)	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Alterações tegumentares (%) ^a			
			Leve		Significativa	
			Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
50	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	50,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	100,0	40,0	0,0	0,0	0,0
75	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	50,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
100	24	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
150	24	40,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
PZQ^b	24	100,0	30,0	10,0	70,0	90,0

^a Porcentagem em relação a 10 pares de vermes.

^b Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

As alterações tegumentares foram avaliadas qualitativamente usando microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 20 - Alterações tegumentares em adultos de *Schistosoma mansoni* durante incubação com o alcaloide epiisopiloturina

Epiisopiloturina ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Alterações tegumentares (%) ^a			
			Leve		Significativa	
			Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
100	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
150	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	33,3	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	55,5	0,0	22,2	0,0
	120	100,0	0,0	0,0	100	0,0
200	24	0,0	33,3	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	55,5	0,0	0,0	0,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
	96	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
	120	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
PZQ^{b,c}	24	100,0	30,0	10,0	70,0	90,0

^a Porcentagem em relação a 9 pares de vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

As alterações tegumentares foram avaliadas qualitativamente usando microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Tabela 21. Alterações tegumentares em adultos de *Schistosoma mansoni* durante incubação com a amida piperina

Piperina ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Alterações tegumentares (%) ^a			
			Leve		Significativa	
			Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
600	24	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	48	0,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
650	24	0,0	100,0	75,0	0,0	25,0
	48	0,0	100,0	8,3	0,0	91,6
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
700	24	0,0	100,0	60,0	0,0	40,0
	48	66,6	13,3	0,0	86,6	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
750	24	0,0	100,0	58,3	0,0	41,6
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
800	24	0,0	40,0	40,0	60,0	60,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
850	24	41,6	25,0	16,6	75,0	83,3
	48	100,0	6,6	0,0	93,3	100,0
	72	100,0	6,6	0,0	93,3	100,0
900	24	60,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
950	24	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
PZQ^{b,c}	24	100,0	30,0	10,0	70,0	90,0

^a Porcentagem em relação a 12 ou 15 pares de vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

As alterações tegumentares foram avaliadas qualitativamente usando microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência.

Os valores correspondem a, pelo menos, três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 22 - Alterações tegumentares em adultos de *Schistosoma mansoni* durante incubação com a lignana grandisina

Grandisina (µg/ml) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Alterações tegumentares (%) ^a			
			Leve		Significativa	
			Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1000	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1500	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2000	24	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	100,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PZQ^{b,c}	24	100,0	30,0	10,0	70,0	90,0

^a Porcentagem em relação a 10 pares de vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 µg/ml).

As alterações tegumentares foram avaliadas qualitativamente usando microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 23 - Alterações tegumentares em adultos de *Schistosoma mansoni* durante incubação com o extrato de *Piper tuberculatum*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Alterações tegumentares (%) ^a			
			Leve		Significativa	
			Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	10,0	0,0	0,0	0,0
5	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	100,0	80,0	0,0	0,0	0,0
10	24	100,0	60,0	10,0	40,0	0,0
	48	100,0	60,0	10,0	40,0	0,0
	72	100,0	60,0	10,0	40,0	0,0
15	24	100,0	40,0	40,0	60,0	0,0
	48	100,0	40,0	40,0	60,0	0,0
	72	100,0	40,0	40,0	60,0	0,0
25	24	100,0	10,0	60,0	80,0	0,0
	48	100,0	10,0	60,0	80,0	0,0
	72	100,0	10,0	60,0	80,0	0,0
50	24	100,0	10,0	100,0	90,0	0,0
	48	100,0	10,0	100,0	90,0	0,0
	72	100,0	10,0	100,0	90,0	0,0
75	24	100,0	0,0	40,0	100,0	60,0
	48	100,0	0,0	40,0	100,0	60,0
	72	100,0	0,0	40,0	100,0	60,0
100	24	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
PZQ^{b,c}	24	100,0	30,0	10,0	70,0	90,0

^a Porcentagem em relação a 10 pares de vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

As alterações tegumentares foram avaliadas qualitativamente usando microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 24 - Alterações tegumentares em adultos de *Schistosoma mansoni* durante incubação com o extrato de *Piper crassinervium*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Alterações tegumentares (%) ^a			
			Leve		Significativa	
			Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
60	24	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	50,0	0,0	0,0	0,0
	72	100,0	70,0	0,0	30,0	0,0
70	24	50,0	60,0	50,0	40,0	50,0
	48	100,0	60,0	50,0	40,0	50,0
	72	100,0	60,0	50,0	40,0	50,0
100	24	100,0	0,0	10,0	100,0	90,0
	48	100,0	0,0	10,0	100,0	90,0
	72	100,0	0,0	10,0	100,0	90,0
150	24	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
PZQ^{b,c}	24	100,0	30,0	10,0	70,0	90,0

^a Porcentagem em relação a 10 pares de vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

As alterações tegumentares foram avaliadas qualitativamente usando microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 25 - Alterações tegumentares em adultos de *Schistosoma mansoni* durante incubação com o extrato de *Piper diospyrifolium*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Alterações tegumentares (%) ^a			
			Leve		Significativa	
			Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
70	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
	72	63,3	0,0	100,0	0,0	0,0
100	24	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
	48	63,3	0,0	0,0	0,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	0,0	100,0
250	24	100,0	100,0	0,0	0,0	100,0
	48	100,0	100,0	0,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	0,0	100,0
800	24	100,0	100,0	0,0	0,0	100,0
	48	100,0	100,0	0,0	0,0	100,0
	72	100,0	100,0	0,0	0,0	100,0
PZQ^{b,c}	24	100,0	30,0	10,0	70,0	90,0

^a Porcentagem em relação a 12 ou 15 pares de vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

As alterações tegumentares foram avaliadas qualitativamente usando microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência.

Os valores correspondem a, pelo menos, três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 26 - Alterações tegumentares em adultos de *Schistosoma mansoni* durante incubação com o extrato de *Piper fuligineum*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Alterações tegumentares (%) ^a			
			Leve		Significativa	
			Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
40	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	20,0	0,0	0,0
50	24	0,0	0,0	53,3	0,0	0,0
	48	20,0	0,0	60,0	0,0	40,0
	72	56,6	0,0	20,0	0,0	60,0
70	24	0,0	20,0	100,0	0,0	0,0
	48	50,0	40,0	0,0	0,0	100,0
	72	100,0	60,0	0,0	20,0	100,0
80	24	0,0	0,0	100,0	0,0	0,0
	48	53,3	40,0	0,0	20,0	100,0
	72	100,0	33,3	0,0	66,6	100,0
90	24	0,0	13,3	20,0	0,0	60,0
	48	100,0	20,0	0,0	80,0	100,0
	72	100,0	20,0	0,0	80,0	100,0
100	24	50,0	100,0	0,0	0,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
150	24	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
PZQ^{b,c}	24	100,0	30,0	10,0	70,0	90,0

^a Porcentagem em relação a 12 ou 15 pares de vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

As alterações tegumentares foram avaliadas qualitativamente usando microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência.

Os valores correspondem a, pelo menos, três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 27 - Alterações tegumentares em adultos de *Schistosoma mansoni* durante incubação com o extrato de *Piper gaudichaudianum*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Alterações tegumentares (%) ^a			
			Leve		Significativa	
			Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
75	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	20,0	70,0	0,0	30,0	0,0
100	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	5,0	50,0	0,0	50,0	0,0
	72	70,0	20,0	0,0	80,0	0,0
125	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	15,0	50,0	0,0	50,0	0,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
150	24	0,0	100,0	0,0	0,0	0,0
	48	35,0	20,0	30,0	80,0	0,0
	72	100,0	0,0	100,0	100,0	0,0
200	24	50,0	0,0	0,0	100,0	0,0
	48	50,0	0,0	50,0	100,0	0,0
	72	100,0	0,0	100,0	100,0	0,0
300	24	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
PZQ^{b,c}	24	100,0	30,0	10,0	70,0	90,0

^a Porcentagem em relação a 10 pares de vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

As alterações tegumentares foram avaliadas qualitativamente usando microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Tabela 28 - Alterações tegumentares em adultos de *Schistosoma mansoni* durante incubação com o extrato de *Pothomorphe umbellata*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$)	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a	Alterações tegumentares (%) ^a			
			Leve		Significativa	
			Macho	Fêmea	Macho	Fêmea
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
40	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	30,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	70,0	0,0	0,0	0,0
50	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	60,0	0,0	10,0	0,0
	72	0,0	70,0	0,0	30,0	0,0
60	24	0,0	20,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	50,0	0,0	50,0	0,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	0,0
75	24	0,0	20,0	10,0	0,0	0,0
	48	0,0	40,0	70,0	60,0	30,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
100	24	0,0	80,0	100,0	20,0	0,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
150	24	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	48	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	100,0	0,0	0,0	100,0	100,0
PZQ^{b,c}	24	100,0	30,0	10,0	70,0	90,0

^a Porcentagem em relação a 10 pares de vermes.

^b Em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$).

As alterações tegumentares foram avaliadas qualitativamente usando microscópio invertido com técnica de campo claro ou contraste de interferência.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas.

Não obstante a análise subjetiva para avaliar o efeito dos compostos e extratos no tegumento de *Schistosoma mansoni*, esse critério qualitativo é comumente empregado nos ensaios in vitro (RAMIREZ et al., 2007; XIAO et al., 2007; BRAGUINE et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009, 2010; KEISER et al., 2010; PARREIRA et al., 2010; NEVES et al., 2010; MORAES et al., 2011a, 2011b). Entretanto, por microscopia de luz, a observação morfológica do tegumento dos parasitas não permite avaliar os danos de forma detalhada.

Trabalho recente do nosso grupo descreve que as formas larvais de trematódeos (cercárias), incluindo a do *S. mansoni*, são autofluorescentes e, portanto, são visualizadas em microscopia confocal sem a presença de um fluoróforo marcador (MORAES et al., 2009). Além disso, quando os parasitas são fixados solução contendo ácido acético, formaldeído e álcool (AFA, ver Materiais e Métodos item 4.7), a

fluorescência é melhorada. Experimentos pilotos com as diferentes fases de *S. mansoni* (cercárias, esquistossômulos e adultos) mostraram que o ácido acético é fundamental para o melhoramento da fluorescência.

Nesse contexto, a fim de que seja realizada uma análise mais detalhada sobre o efeito dos compostos e extratos no tegumento de *S. mansoni*, os parasitas foram fixados em solução AFA e analisados com um microscópio confocal de varredura a laser (LSM 510 META, Zeiss). Comparativamente a vermes controles incubados apenas em meio RPMI, os danos nos tubérculos foram diretamente dependentes da concentração dos compostos ou extratos (Figuras 18-28).

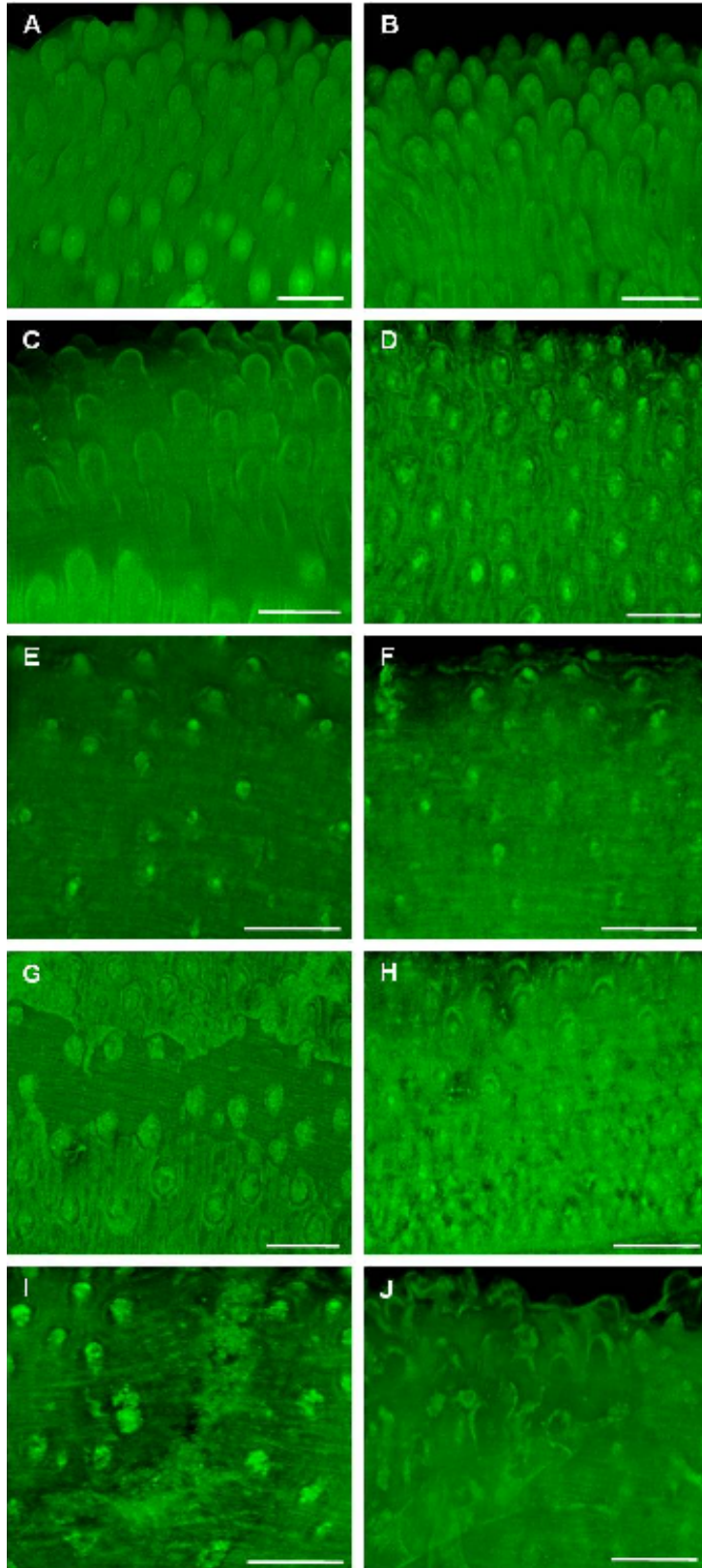


Figura 18. **Efeito da amida pipartina no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo pipartina em diferentes concentrações. Após 24 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e analisados com microscópio confocal. **A:** controle, sem adição de pipartina. **B:** 2 µg/ml. **C:** 5 µg/ml. **D:** 10 µg/ml. **E:** 25 µg/ml. **F:** 50 µg/ml. **G:** 100 µg/ml. **H:** 125 µg/ml. **I:** 150 µg/ml. **J:** 200 µg/ml. A-J: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 50 µm.

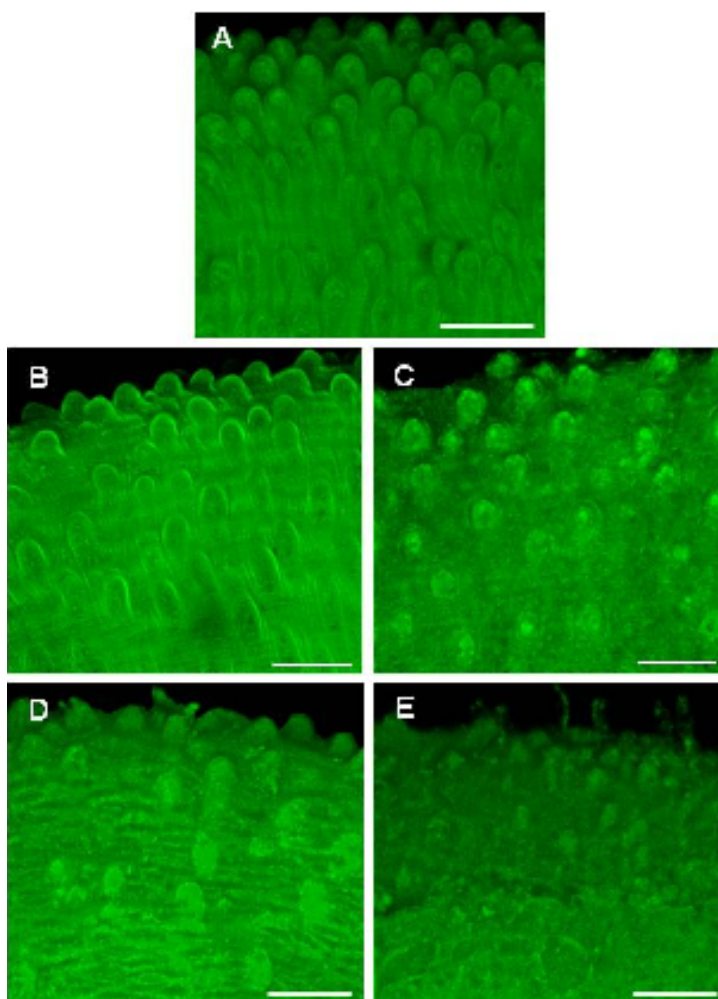


Figura 19. **Efeito do peptídeo dermaseptina 01 no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo dermaseptina em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e analisados com microscópio confocal. **A:** controle, sem adição de dermaseptina. **B:** 50 µg/ml. **C:** 100 µg/ml. **D:** 150 µg/ml. **E:** 200 µg/ml. A-E: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 50 µm.

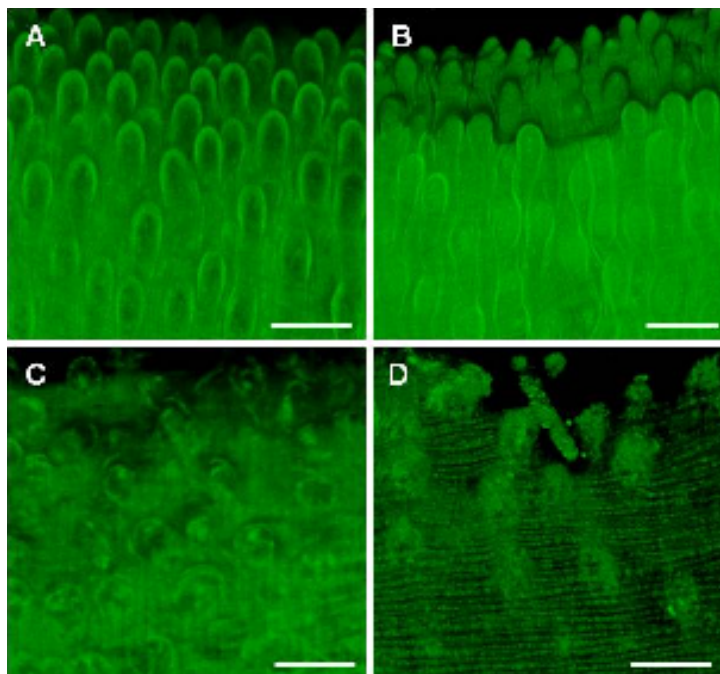


Figura 20. **Efeito do alcaloide episopiloturina no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo episopiloturina em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e analisados com microscópio confocal. **A:** controle, sem adição de episopiloturina. **B:** 100 µg/ml. **C:** 150 µg/ml. **D:** 200 µg/ml. A-D: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 50 µm.

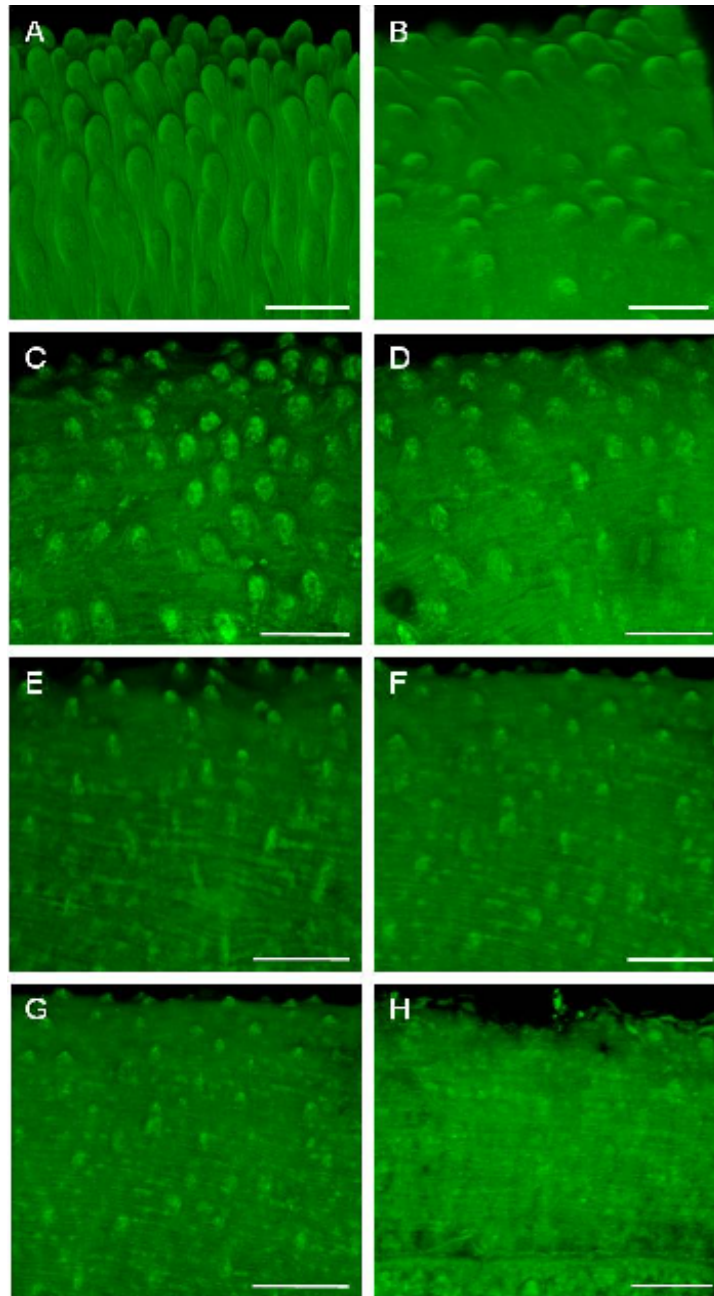


Figura 21. **Efeito da amida piperina no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo piperina em diferentes concentrações. Após 24 horas, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscópio confocal **A**: controle, sem adição de piperina. **B**: 300 µg/ml. **C**: 400 µg/ml. **D**: 500 µg/ml. **E**: 950 µg/ml. **F**: 1250 µg/ml. **G**: 1500 µg/ml. **H**: 1750 µg/ml. A-H: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 50 µm.

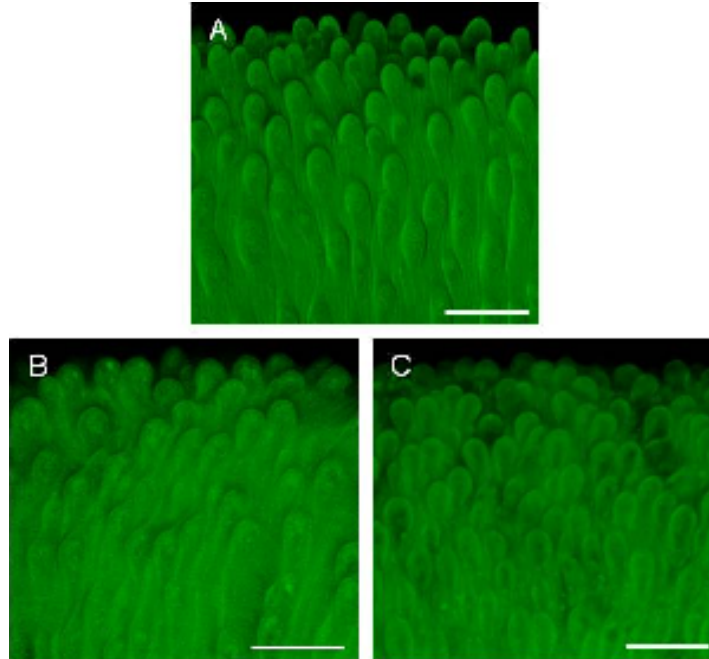


Figura 22. **Efeito da lignana grandisina no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo grandisina em diferentes concentrações. Após 120 horas, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscópio confocal. **A:** controle, sem adição de grandisina. **B:** 1000 µg/ml. **C:** 2000 µg/ml. A-C: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 50 µm.

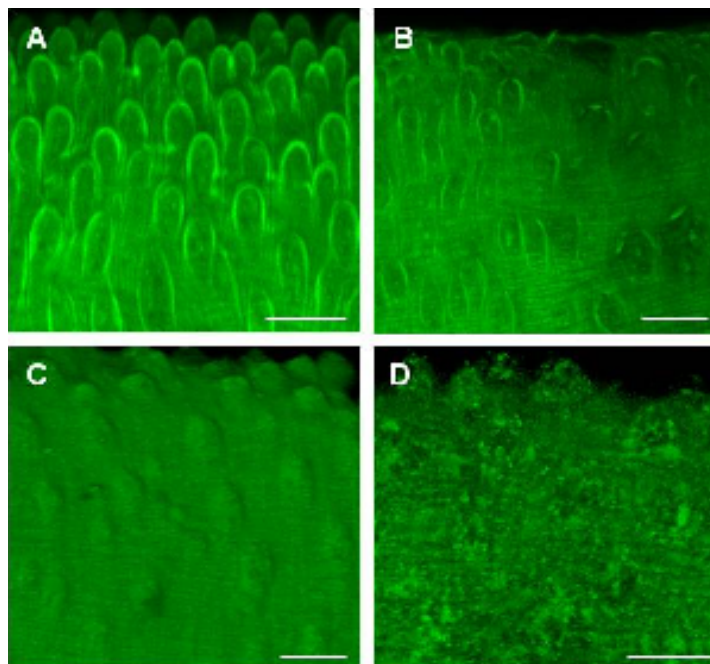


Figura 23. **Efeito do extrato de *Piper tuberculatum* no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo extratos vegetais em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscópio confocal. **A:** controle, sem adição de extrato. **B:** 25 µg/ml. **C:** 50 µg/ml. **D:** 100 µg/ml. A-D: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 50 µm.

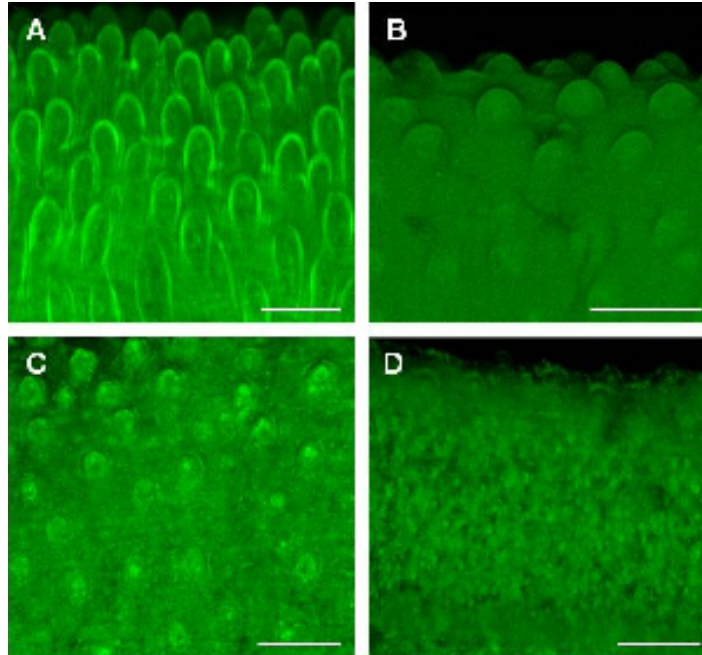


Figura 24. **Efeito do extrato de *Piper crassinervium* no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo extratos vegetais em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscópio confocal. **A:** controle, sem adição de extrato. **B:** 60 µg/ml. **C:** 100 µg/ml. **D:** 200 µg/ml A-D: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 50 µm.

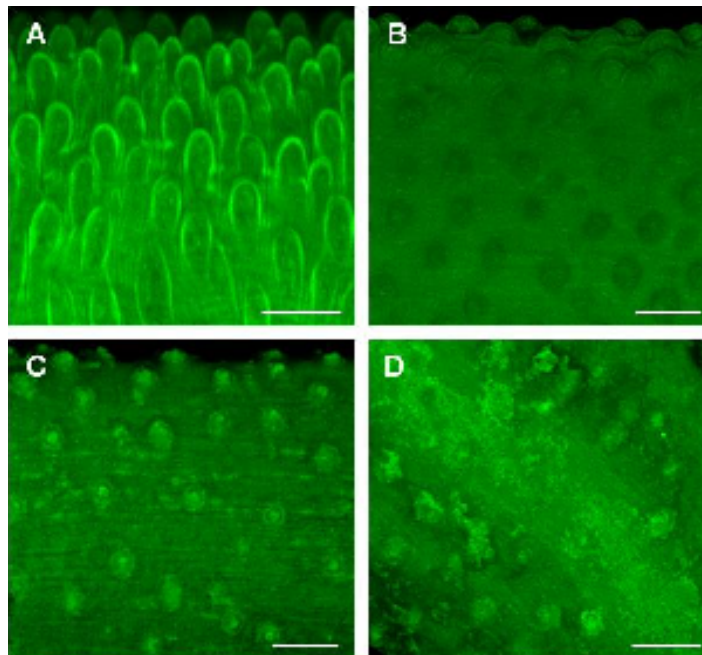


Figura 25. **Efeito do extrato de *Piper diospyrifolium* no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo extratos vegetais em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscópio confocal. **A:** controle, sem adição de extrato. **B:** 50 µg/ml. **C:** 100 µg/ml. **D:** 200 µg/ml A-D: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 50 µm.

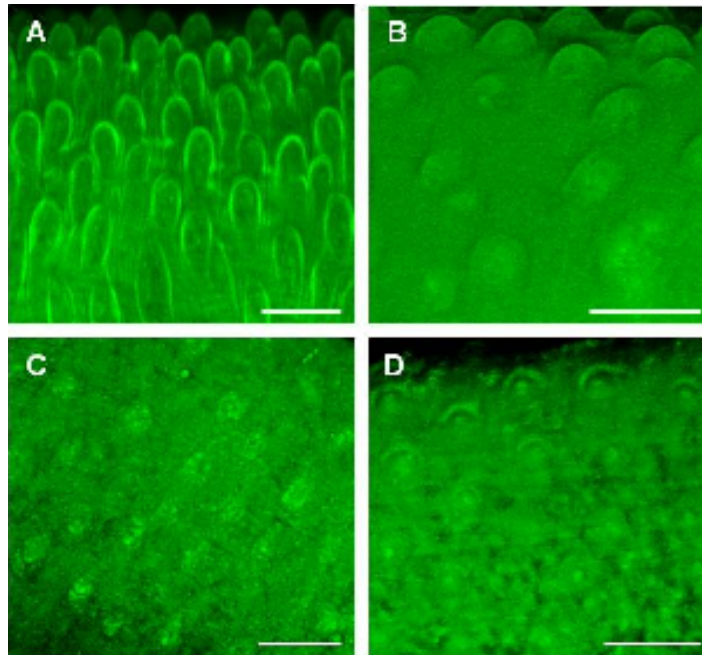


Figura 26. **Efeito do extrato de *Piper fuliginum* no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo extratos vegetais em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscópio confocal. **A:** controle, sem adição de extrato. **B:** 70 µg/ml. **C:** 100 µg/ml. **D:** 200 µg/ml A-D: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 50 µm.

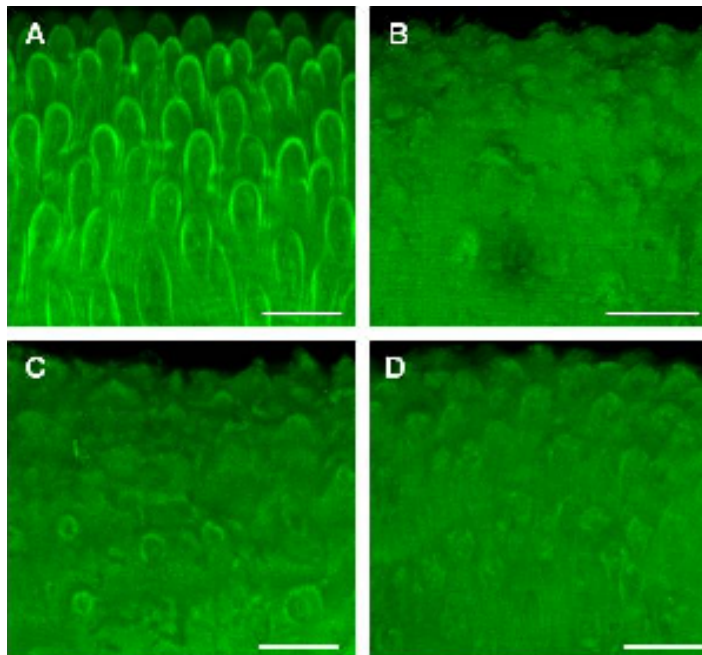


Figura 27. **Efeito do extrato de *Piper gaudichadianum* no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo extratos vegetais em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscópio confocal. **A:** controle, sem adição de extrato. **B:** 50 µg/ml. **C:** 100 µg/ml. **D:** 150 µg/ml A-D: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 50 µm.

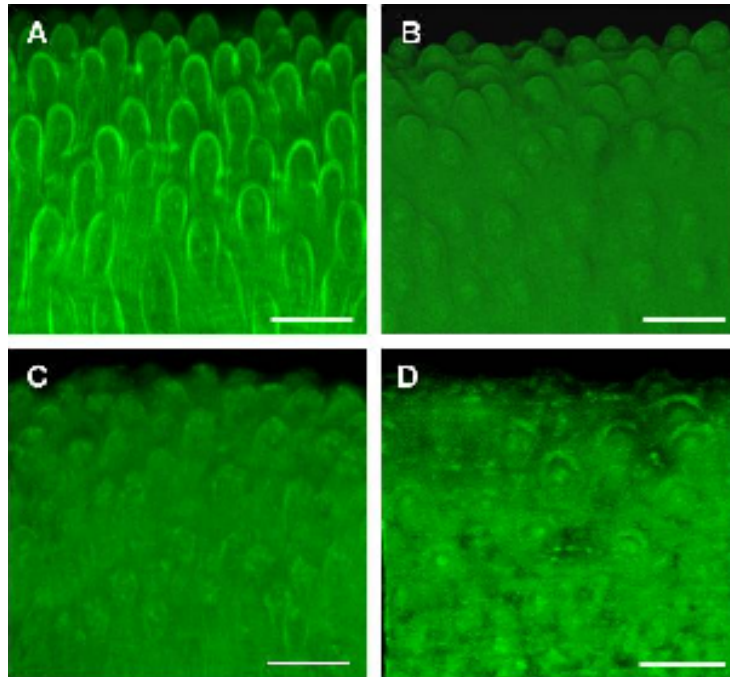


Figura 28. **Efeito do extrato de *Pophomorphe umbellata* no tegumento de machos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo extratos vegetais em diferentes concentrações. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscópio confocal. **A:** controle, sem adição de extrato. **B:** 40 µg/ml. **C:** 75 µg/ml. **D:** 100 µg/ml A-D: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 50 µm.

Em estudos com praziquantel, Willian et al. (2001) e Shuhua et al. (2000a) descreveram danos na superfície do corpo e nas ventosas de esquistosomos. Neste presente estudo, além da análise por microscopia confocal realizada no tegumento de *S. mansoni*, as ventosas (oral e ventral) dos parasitas foram monitoradas quando em presença de compostos e extratos. Os resultados indicaram que somente a amida piplartina causou alterações nas ventosas dos parasitas, principalmente nos helmintos machos. Os danos nas ventosas foram dependentes da concentração da piplartina e mais notadamente acima de 50 µg/ml (Figura 29). Alterações morfológicas no corpo de *Schistosoma mansoni*, sem afetar as ventosas das vermes fêmeas também foram assinaladas em estudos com praziquantel e artemeter (XIAO et al., 1985, 2000a).

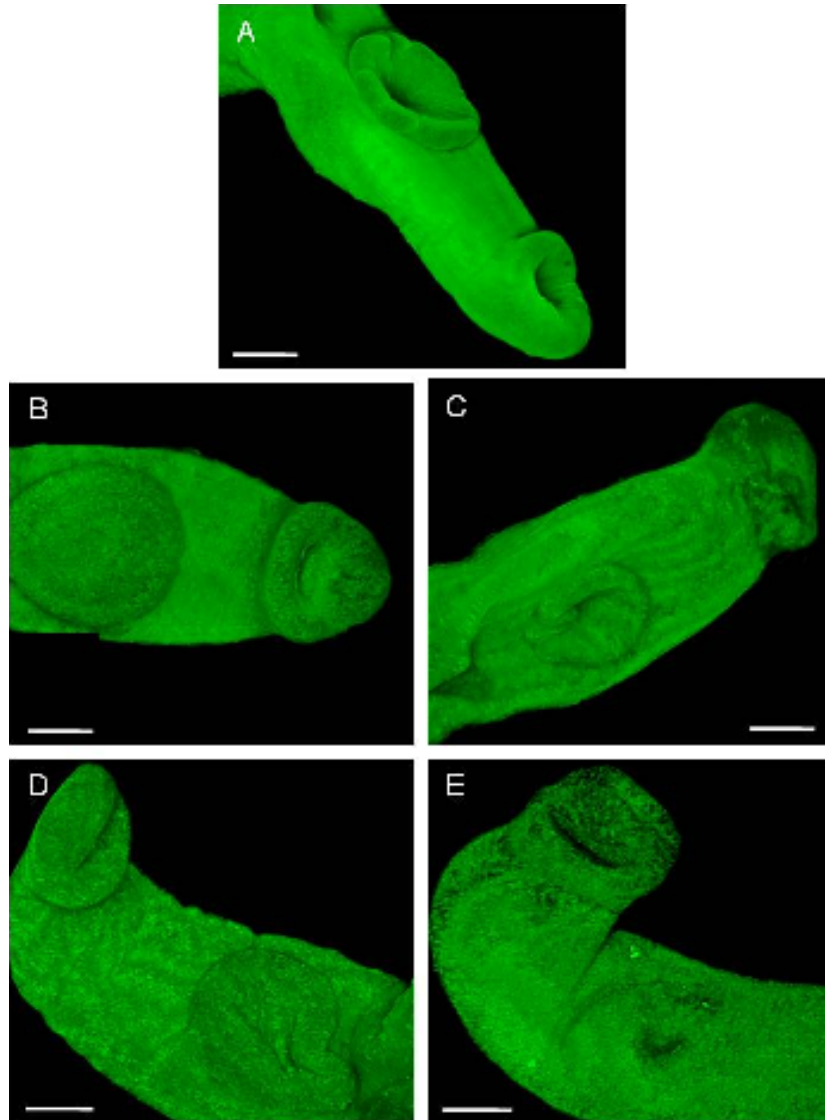


Figura 29. **Efeito da amida piplartina nas ventosas de machos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo piplartina. Após 24 horas, os parasitas machos foram fixados em solução AFA e as ventosas (oral e ventral) foram monitoradas com microscopia confocal **A**: controle, sem adição de piplartina. **B**: piplartina 50 µg/ml. **C**: piplartina 100 µg/ml. **D**: piplartina 150 µg/ml. **E**: piplartina 200 µg/ml. A-E: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 100 µm.

Nos últimos anos intensificou-se a busca por novos anti-helmínticos, mas progressos significativos não têm sido alcançados no desenvolvimento de novas técnicas para o estudo experimental de novos fármacos para a esquistossomose (RAMIREZ et al., 2007; KATZ, 2008) Como citado anteriormente, nas espécies de *Schistosoma*, os modelos experimentais para avaliação do efeito de drogas no tegumento são feitos de forma qualitativa (RAMIREZ et al., 2007; XIAO et al., 2007; BRAGUINE et al., 2009; MAGALHÃES et al., 2009, 2010; PARREIRA et al., 2010; NEVES et al., 2010). No

presente estudo é proposto um modelo experimental que avalia quantitativamente o efeito de drogas no tegumento do *Schistosoma mansoni*.

Em *Schistosoma mansoni*, sabe-se que a topografia da superfície do corpo das fêmeas é mais simples do que a dos machos (RACE et al., 1971; HOCKLEY, 1973). A superfície é inteiramente escavada, não apresentando protuberâncias. Por outro lado, superfície dorsal dos vermes machos é coberta por numerosos tubérculos, enquanto que a superfície entre os tubérculos é composta por estrias planas e rasas, o que facilita a visualização de um eventual dano no tegumento (MACHADO-SILVA et al., 2008; XAVIER et al., 2010).

Com as imagens tridimensionais capturadas por microscopia confocal, os efeitos dos compostos e extratos no tegumento de adultos de *S. mansoni* foram analisados de forma quantitativa. Neste caso, os tubérculos na superfície dorsal de helmintos machos foram avaliados e contados em uma área de 20.000 μm^2 utilizando o software LSM Image Browser (Zeiss), como mostrado na Figura 6 do item 4.7 dos Materiais e Métodos.

Os resultados, no geral, revelaram que os compostos e extratos, exceto grandisina, causaram danos morfológicos nos tubérculos dos parasitas machos. Como indicado nas Figuras 30 e 31, os tubérculos foram afetados de maneira dose dependente e, comparativamente a controles incubados apenas em meio de cultura, os danos são significativos quando os vermes foram incubados com piplartina 25 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,01$), dermaseptina 75 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$), epiisopiloturina 150 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,001$) e piperina 300 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,001$); e os extratos de *Piper tubercularum* 10 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$), *P. crassinervium* 60 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$), *P. diospyrifolium* 50 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,01$), *P. fuligineum* 70 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$), *P. gaudichaudianum* 50 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,001$) e *Pothomorphe umbellata* 30 $\mu\text{g/ml}$ ($P < 0,05$).

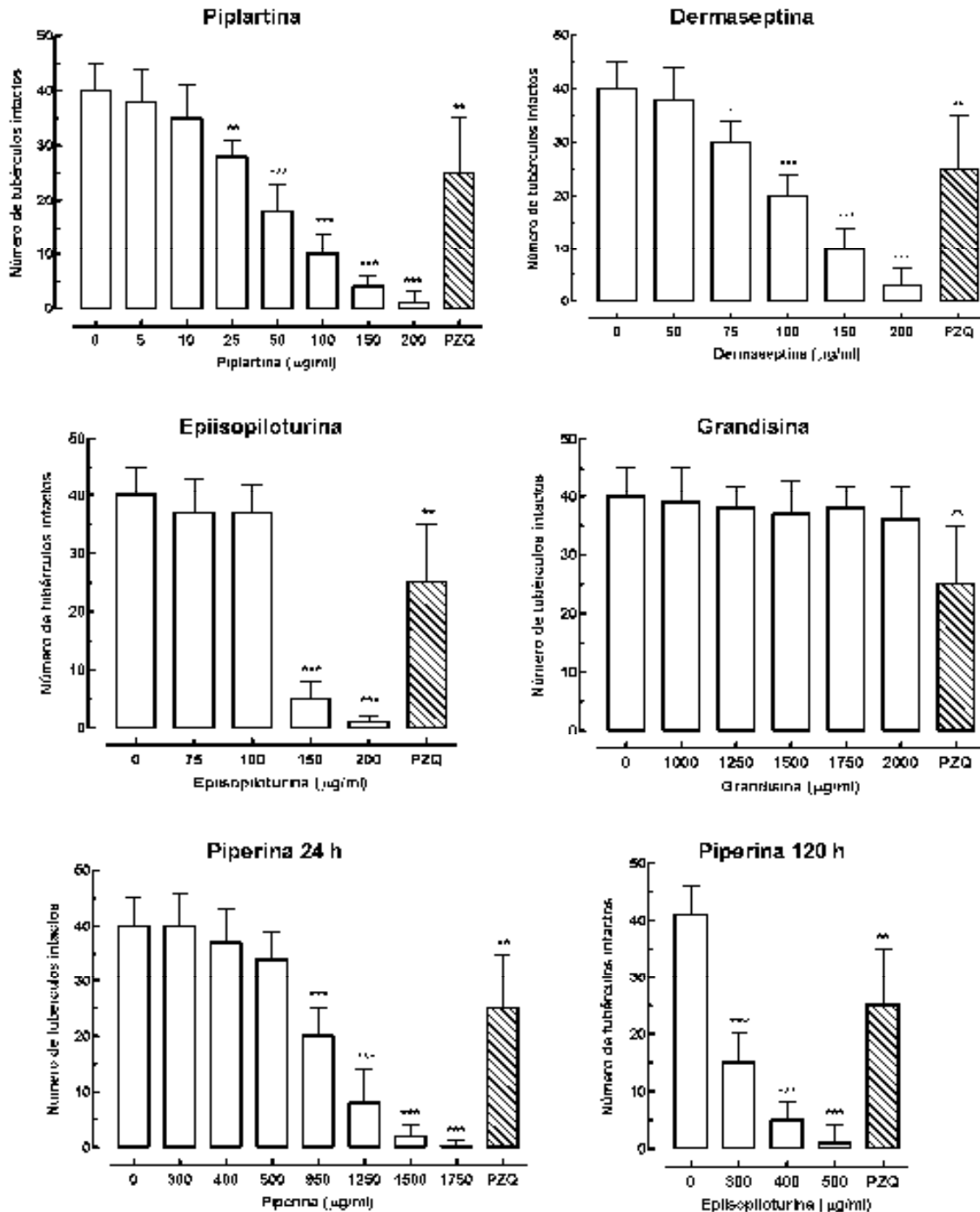


Figura 30. **Efeito de compostos nos tubérculos de machos de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI 1640 contendo os compostos nas concentrações indicadas. Após 120 horas ou ocorrência de morte, com exceção de piperina que foi somente nos tempos indicados, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscopia confocal. Indicados estão os tubérculos intactos, contados em pelo menos três áreas ($20.000 \mu\text{m}^2$) da superfície dorsal dos helmintos machos utilizando o software LSM Image Browser (Zeiss). Os valores são média de dez a quinze vermes de três ou quatro experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas. As barras representam o desvio padrão da média. Diferença significativa entre o controle negativo e os grupos tratados com compostos e praziquantel (PZQ 3 µg/ml): *($P < 0,05$), **($P < 0,01$), ***($P < 0,001$).

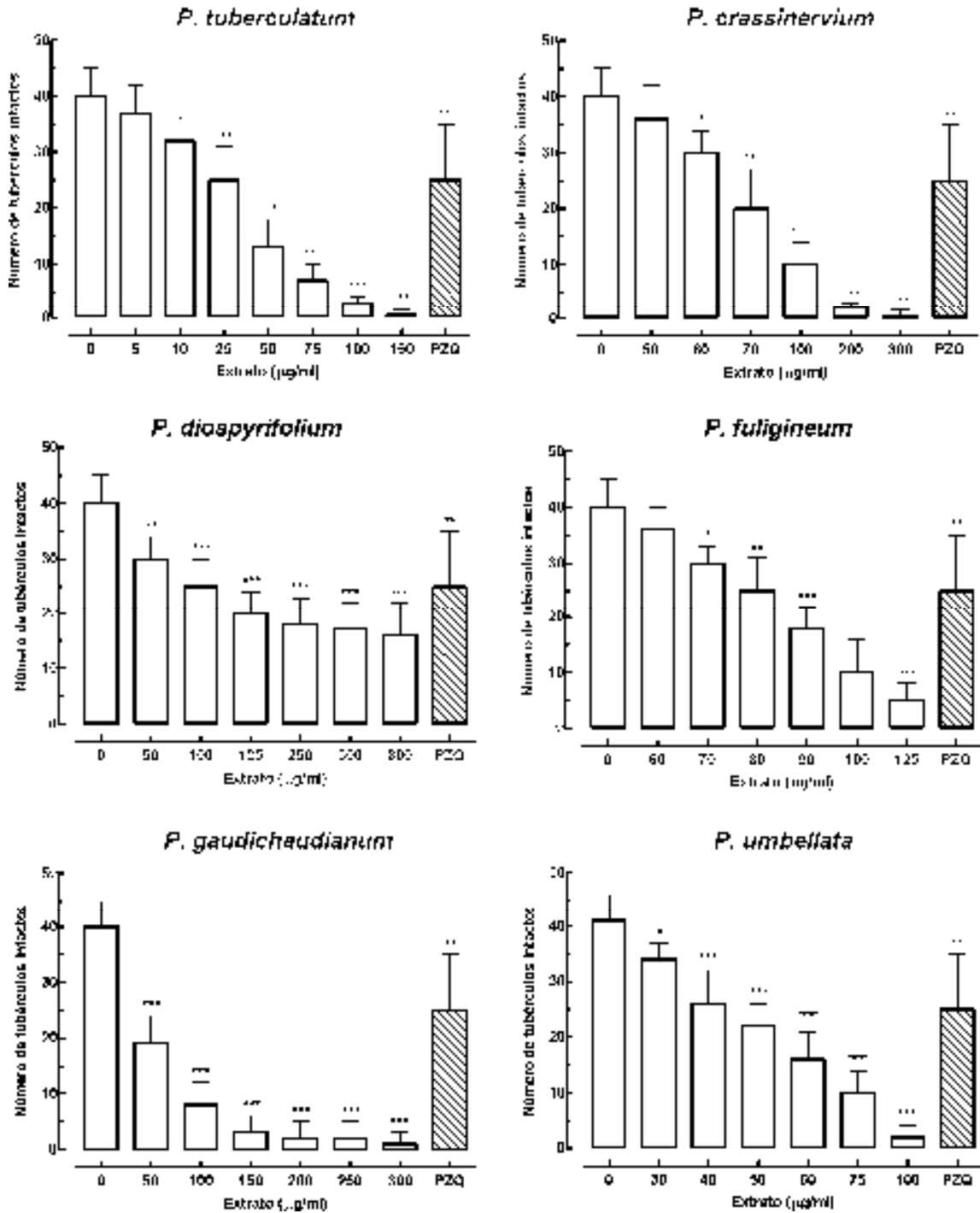


Figura 31. **Efeito de extratos vegetais nos tubérculos de machos de *Schistosoma mansoni*.**

Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI 1640 contendo os extratos nas concentrações indicadas. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscopia confocal. Indicados estão os tubérculos intactos, contados em pelo menos três áreas ($20.000 \mu\text{m}^2$) da superfície dorsal dos helmintos machos utilizando o software LSM Image Browser (Zeiss). Os valores são média de dez a quinze vermes de três ou quatro experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas. As barras representam o desvio padrão da média.

Diferença significativa entre o controle negativo e os grupos tratados com extratos e praziquantel (PZQ 3 $\mu\text{g/ml}$): *($P < 0,05$), **($P < 0,01$), ***($P < 0,001$).

Na maioria dos compostos e extratos vegetais ensaiados, a mortalidade dos parasitas adultos está associada à lesão no tegumento. De fato, as concentrações letais dos produtos naturais ensaiados estão muito próximas às concentrações que causaram danos no tegumento de adultos de *S. mansoni*. Por exemplo, o alcaloide epiisopiloturina possui efeito esquistosomicida nas concentrações superiores a 150 µg/ml (Figura 9), o que corrobora os danos morfológicos no tegumento (Figuras 20 e 30). Outro exemplo, agora com extrato vegetal, a ação letal aos adultos de *S. mansoni* em presença de extrato de folhas de *Piper crassinervium* foi notada com 60 µg/ml (Figura 13); sendo a mesma concentração que afetou os tubérculos dos vermes adultos (Figuras 24 e 31). Por outro lado, o efeito esquistosomicida da amida piplartina não está associado à lesão no tegumento. Em presença desta amida nota-se mortalidade de 100% com 3 µg/ml (Figura 4), mas os tubérculos foram significativamente afetados somente com piplartina 25 µg/ml (Figuras 18 e 30); ou seja, o tegumento foi afetado em uma concentração cerca de 8 vezes maior que a concentração letal. Como consta no ANEXO A, a morte dos adultos de *S. mansoni* em presença da amida piplartina está associada a outro(s) mecanismo(s), cujo modo de ação ainda é desconhecido (MORAES et al., 2011a).

5.3 Efeito de compostos e extratos na oviposição de *Schistosoma mansoni*

A patologia da esquistossomose está associada, principalmente, à presença de ovos de *Schistosoma* no tecido do hospedeiro (GRYSEELS et al., 2006; WILSON et al., 2007). Dessa forma, na busca de novos compostos para a terapêutica experimental deve-se considerar drogas supressoras, que acabem com a oviposição das fêmeas e, portanto, eliminem o principal agente patogênico, o ovo, além de interromper a transmissão da helmintose (KATZ, 2008). O objetivo desta parte do trabalho foi avaliar a capacidade reprodutiva de *Schistosoma mansoni* quando em presença de extratos e compostos em concentrações subletais.

A capacidade reprodutiva de *S. mansoni* foi avaliada pela observação dos efeitos da exposição no acasalamento e oviposição das fêmeas. Nos experimentos, os helmintos adultos acasalados foram incubados, in vitro, durante cinco dias em placas de 24 poços contendo compostos ou extratos em meio RPMI suplementado com 10% de soro a 37 °C, em atmosfera de CO₂ a 5%. O número de ovos foi contado diariamente com o auxílio de um estereomicroscópio (SANDERSON; BARTLETT; WHITFIELD, 2002; MITSUI; MIURA; AOKI, 2009; BRAGUINE et al., 2009; MORAES et al., 2011a, 2011b).

5.3.1 Efeito de compostos e extratos, em concentrações subletais, na oviposição de adultos de *Schistosoma mansoni*

A partir do monitoramento in vitro dos adultos acasalados de *Schistosoma mansoni*, foi possível constatar uma redução na oviposição do parasita de maneira dose dependente nas concentrações subletais dos compostos e extratos (Figuras 32 e 33). Nos vermes expostos, a contagem de ovos nos experimentos foi significativamente reduzida ($p < 0,05$ a $p < 0,001$) e mais notadamente a partir do segundo dia, sendo exceções: grandisina e o extrato *Piper gaudichaudianum*, em todas as concentrações ensaiadas. Considerando a maior concentração subletal, comparativamente a controles incubados apenas em meio de cultura, no término do período de incubação o número de ovos foi significativamente menor com piplartina 2 µg/ml ($p < 0,001$), dermaseptina 75 µg/ml ($p < 0,001$), epiisopiloturina 100 µg/ml ($p < 0,001$), piperina 300 µg/ml ($p < 0,01$) e com os extratos de *Piper tuberculatum* 3 µg/ml ($p < 0,001$), *P. crasssinervium* 50 µg/ml ($p < 0,001$), *P. diospyrifolium* 50 µg/ml ($p < 0,01$), *P. fuligineum* 40 µg/ml ($p < 0,001$) e *Pothomorphe umbellata* 50 µg/ml ($p < 0,05$). As contagens diárias de ovos eliminados pelas fêmeas de *S. mansoni* nas culturas contendo compostos ou extratos, em diferentes concentrações e tempo de incubação, são mostradas nas Figuras 32 e 33.

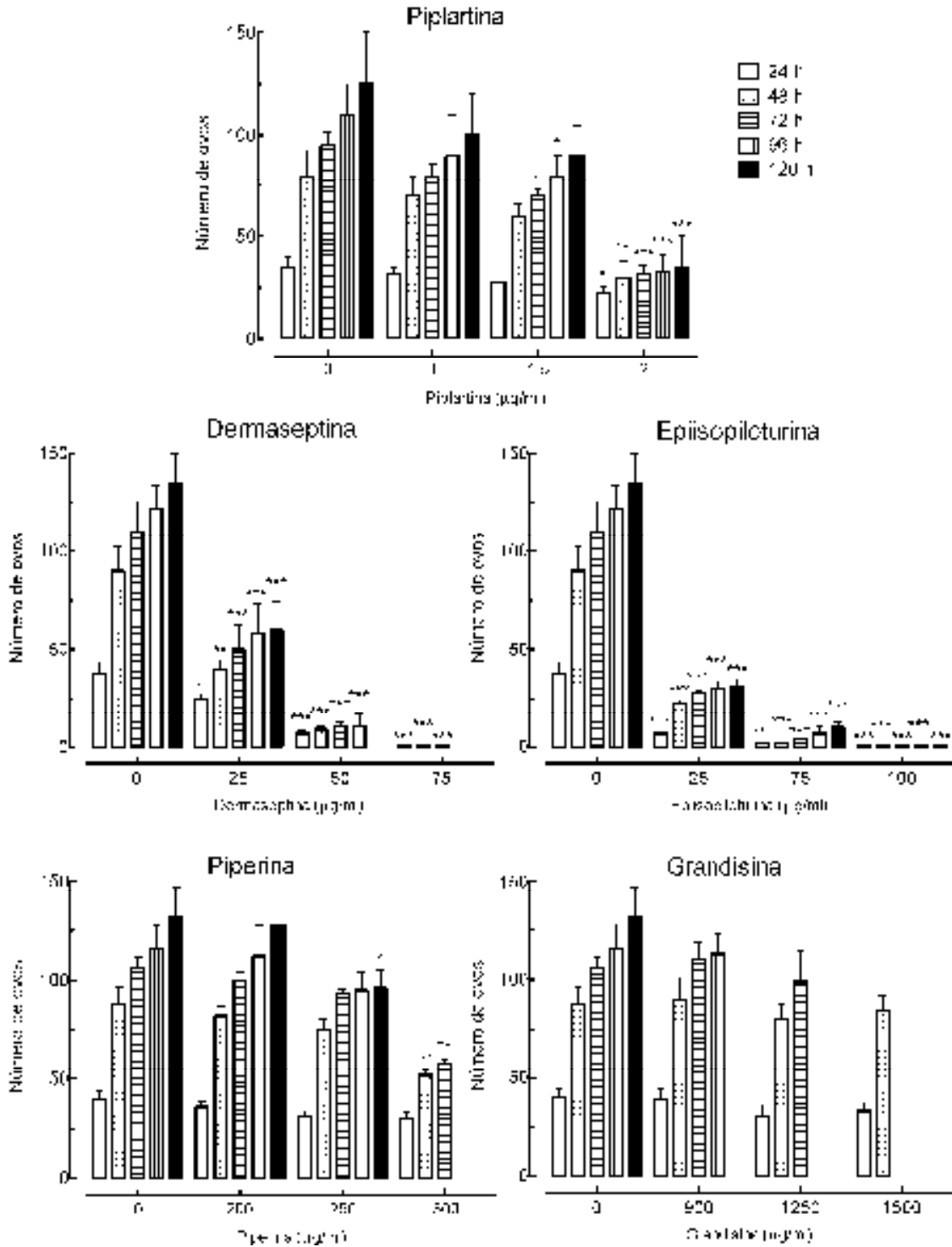


Figura 32. **Efeito de compostos na oviposição de fêmeas de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo os compostos em diferentes concentrações. As contagens de ovos foram realizadas diariamente, nos tempos indicados, antes da separação dos casais de vermes ou da ação helmintíca. Os valores são média de dez a quinze casais adultos acasalados, no total de três ou quatro experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas. As barras representam o desvio padrão da média. Diferença significativa entre o controle negativo e os compostos: *($P < 0,05$), **($P < 0,01$), ***($P < 0,001$).

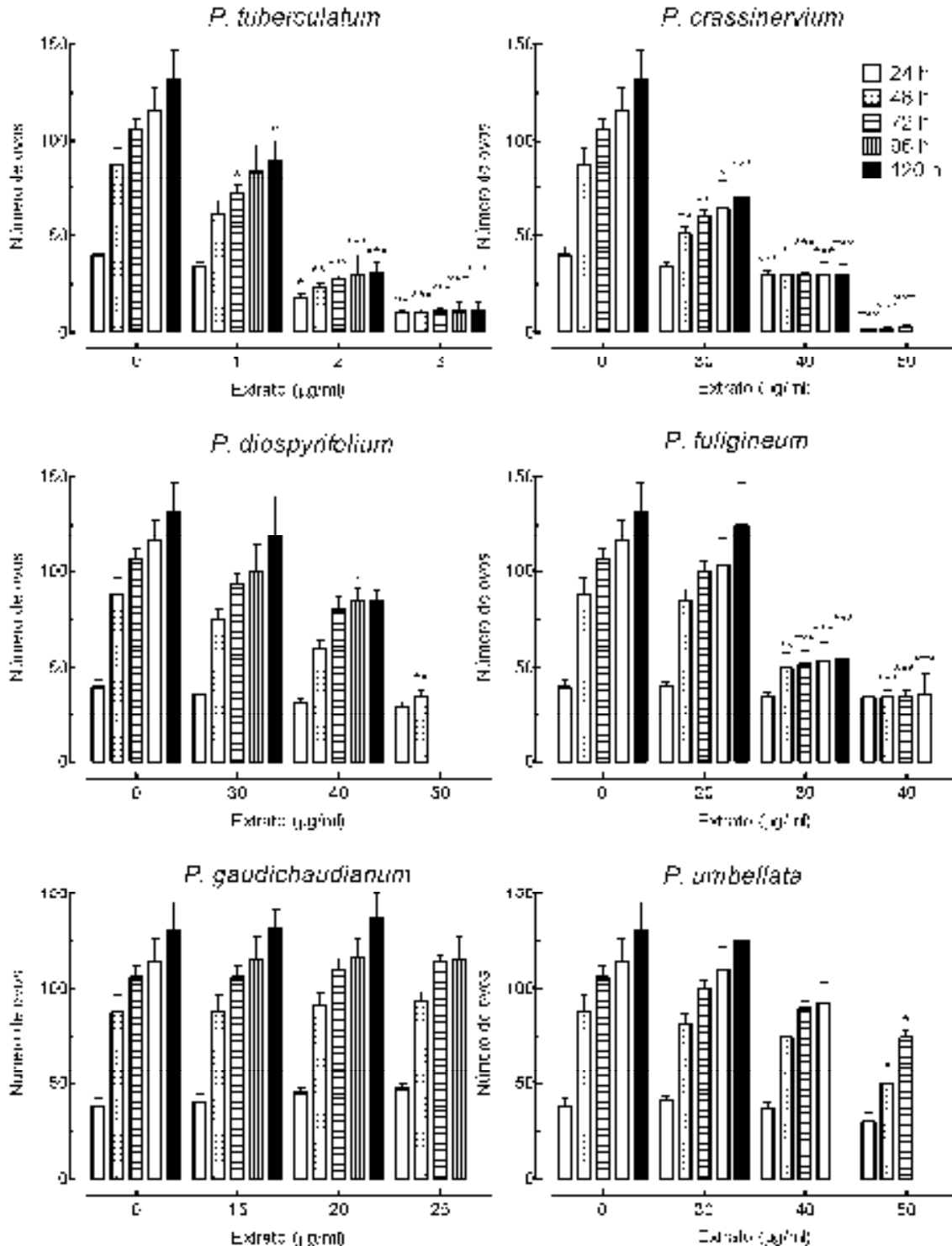


Figura 33. **Efeito de extratos de plantas na oviposição de fêmeas de *Schistosoma mansoni*.** Os pares de vermes acasalados (machos e fêmeas) foram incubados em meio RPMI contendo os extratos em diferentes concentrações. As contagens de ovos foram realizadas diariamente, nos tempos indicados, antes da separação dos casais de vermes ou da ação helmintíctica. Os valores são média de dez a quinze casais adultos acasalados, no total de três ou quatro experimentos feitos em triplicatas ou quadruplicatas. As barras representam o desvio padrão da média. Diferença significativa entre o controle negativo e os extratos: *($P < 0,05$), **($P < 0,01$), ***($P < 0,001$).

Alguns estudos in vitro também relatam a redução na oviposição de *S. mansoni* por compostos ou extratos vegetais. Por exemplo, curcumina 5 μM a 10 μM reduz o número de ovos em cerca de 40 a 50% (MAGALHÃES et al., 2009). Os derivados de floroglucinóis, tais como aspidina, aspidinol, ácido flavaspídico e desaspidina, todos na concentração de 10 μM , causam inibição na oviposição em cerca 95%, 58%, 92% e 91%, respectivamente (MAGALHÃES et al., 2010). O extrato etanólico e compostos isolados de folhas de *Zanthoxylum naranjillo* Griseb (Rutaceae), popularmente conhecido como juva, naranjillo ou tembetari, reduziram a postura das fêmeas em cerca de 16% com 100 $\mu\text{g/ml}$ de extrato, e entre 13% e 30% com 100 μM dos compostos (BRAGUINE et al., 2009). A redução no número de ovos também foi assinalada com artenusato e imidazolidinas, bem como com extratos de semente de *Nigella sativa* L. (Ranunculaceae), popularmente conhecido como aliprive, cominho ou diabo-na-mata, e rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae), popularmente conhecido como gengibre ou mangaratá (MOHAMED et al., 2005; SANDERSON; BARTLETT; WHITFIELD, 2002; MITSUI; MIURA; AOKI, 2009; NEVES et al., 2010).

Em geral, considerando os compostos e extratos vegetais utilizados neste estudo, dermaseptina 75 $\mu\text{g/ml}$ e epiisopiloturina 100 $\mu\text{g/ml}$ causaram uma redução de 100% no número de ovos; enquanto que os extratos de *Piper crassinervium* e *P. tuberculatum* reduziram, respectivamente, a oviposição em cerca de 98% e 92%. A Tabela 29 mostra o percentual de redução da postura das fêmeas de *S. mansoni* em presença de compostos e extratos.

Tabela 29 - Redução do número de ovos de *Schistosoma mansoni* durante incubação com compostos e extratos vegetais

Compostos/Extratos	Concentração ^a		Redução do número de ovos
	µg/ml	µM	
Dermaseptina 01	75	26,84	100 *
Epiisopiloturina	100	349,65	100
Piplartina	2	6,3	76,28 ± 4,17
Piperina	300	1.051,45	46,73 ± 2,42
Grandisina	1250	4.381,05	0,58 ± 0,5
<i>Piper crassinervium</i>	50	--	97,97 ± 2,42
<i>Piper tuberculatum</i>	3	--	92,03 ± 1,76
<i>Piper fuligineum</i>	40	--	68,78 ± 5,42
<i>Piper diospyrifolium</i>	50	--	60,01 ± 4,86
<i>Pothomorphe umbellata</i>	50	--	30,08 ± 3,42
<i>Piper gaudichaudianum</i>	25	--	0,31 ± 0,78
PZQ ^b	1	3,2	0,44 ± 0,18

* Valores expressos em porcentagem em relação ao grupo controle, isto é, parasitas em DMSO 0,2% no meio RPMI.

^a Concentração máxima com parasitas viáveis acasalados.

^b Controle positivo: Praziquantel (PZQ).

Os valores são média ± desvio padrão de, pelo menos, três experimentos realizados triplicatas.

Considerando a redução na oviposição dos esquistossomos em presença de compostos e extratos, experimentos adicionais foram realizados com a amida piplartina com o objetivo de verificar se a inibição na postura das fêmeas era reversível. Nos ensaios, os parasitas foram mantidos em presença de piplartina 2 µg/ml (6,3 µM) por até 48 horas. No dia subsequente, os vermes eram lavados três vezes em meio RPMI (procedimento este de forma cuidadosa para evitar a separação dos casais) e então incubados com o meio sem a presença do composto. Grupos controles, sem adição de piplartina, foram submetidos ao mesmo procedimento. O resultado obtido após 96 horas foi uma redução do número de ovos de 72,58% ± 3,41% (média ± desvio padrão de três experimentos independentes realizados em triplicatas, n=10 casais de vermes), um padrão semelhante aos experimentos feitos com a amida mantida constantemente nas culturas (Tabela 29). Dessa forma, constatou-se que a alteração na postura das fêmeas causada pela piplartina foi irreversível.

A redução na oviposição pode ser causada por alterações no sistema reprodutivo de machos e/ou fêmeas. De fato, fármacos como a lovastatina, um potente inibidor de síntese endógena de colesterol, causam redução na oviposição de *S. mansoni*. Os estudos morfológicos de adultos expostos a lovastatina mostraram alterações degenerativas, sendo as principais no aparelho reprodutor, com redução e alteração dos folículos vitelínicos e do ovário das fêmeas e modificações nos testículos dos machos (ARAÚJO et al. 2002). Da mesma forma, a estreptozotocina, uma indutora de *diabetes mellitus*, afeta a oogênese e espermatogênese e pode causar esterilização dos esquistossomos. De fato, Hulstijn et al. (2003) mostraram que a estreptozotocina reduz a oviposição e causa alterações nos órgãos reprodutivos de machos e fêmeas de *S. mansoni* como atrofia dos lobos testiculares e ovários, além de inibição de espermatozoides e redução total ou parcial de ovócitos. Degeneração e atrofia em ovários e testículos de esquistossomos expostos ao artemeter também foram assinalados por Xiao e Catto (1989).

No presente estudo não foi verificado se os compostos ou extratos ensaiados causam alterações morfológicas nos órgãos reprodutivos. Entretanto, baseado na redução significativa do número de ovos, até mesmo de forma irreversível como mostrado com piplartina, é provável que os órgãos reprodutores dos vermes adultos de *S. mansoni* tenham sofrido alterações morfológicas e afetado a oogênese e/ou espermatogênese.

5.4 Alterações na viabilidade e no tegumento de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades, em presença de compostos e extratos

Quando as cercárias de esquistossomos penetram na pele dos hospedeiros definitivos sofrem nova organização que altera sua fisiologia e morfologia. Assim que se encontra nos tecidos da pele, o corpo cercariano transforma-se em esquistossômulo, um organismo já com aspecto vermiforme e que representa as formas jovens do helminto. Essa transformação é representada por respiração anaeróbica, perda da cauda, eliminação progressiva do glicocálix, esvaziamento das glândulas secretoras e reorganização do tegumento. Após a invasão da pele e transformação em esquistossômulo, o parasita necessita se deslocar da epiderme em direção à derme e sair por via sanguínea ou linfática. A permanência na pele se limita a dois ou três dias, ao fim dos quais o parasita acaba por penetrar em um vaso cutâneo e é passivamente arrastado pela circulação em direção ao coração e aos pulmões. Dependendo do hospedeiro, os esquistossômulos podem ser encontrados nos pulmões desde o quarto dia e alcançam as concentrações máximas entre o quinto e o sexto dia (RAMALHO-PINTO et al., 1974, 1975; STIREWALT, 1974; SKELLY e SHOEMAKER, 2000; MCKERROW e SALTER, 2002; SKELLY e ALAN WILSON, 2006; GOBERT; CHAI; MCMANUS, 2007).

Na busca de novos compostos para a terapêutica experimental deve-se considerar drogas profiláticas, que irão prevenir a infecção por agirem nas formas jovens do *Schistosoma* (RAMIREZ et al., 2007; KEISER, 2010). Esta parte do trabalho avaliou o efeito de compostos e extratos em esquistossômulos com diferentes idades. Os parâmetros avaliados foram: a) viabilidade; b) efeito no tegumento. Nos experimentos, os esquistossômulos com diferentes idades in vitro (recém-transformados, 1, 3, 5 e 7 dias) foram incubados durante cinco dias em placas de 96 poços contendo compostos ou extratos em meio 169 com DMSO 0,2% a 37 °C, em atmosfera de CO₂ a 5%. Poços contendo somente meio de cultura ou meio com DMSO 0,2% foram usados como controle. As culturas foram monitoradas diariamente por até cinco dias, com o auxílio de um microscópio invertido. No término do período de incubação ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados e monitorados por microscópio confocal.

5.4.1 Alterações na viabilidade de esquistossômulos, com diferentes idades, em presença de compostos e extratos

O praziquantel, fármaco de escolha para o tratamento da esquistossomose, é eficaz somente contra as formas adultas de esquistossomo. De fato, os esquistossômulos apresentam baixa susceptibilidade ao praziquantel que, portanto, não é usado como fármaco profilático (SABAH et al., 1986; UTZINGER et al., 2003). No presente estudo, praziquantel 3 µg/ml (9,6 µM) foi utilizado como controle positivo nos ensaios com vermes adultos. Nos experimentos com esquistossômulos (recém-transformado, 1, 3, 5 e 7 dias de idade) foi testado praziquantel em diferentes concentrações. Como indicado na

Tabela 30, o efeito anti-helmítico do praziquantel foi notado somente nas concentrações iguais ou maiores que 150 µg/ml (480,15 µM) independente da idade dos esquistossômulos; a mortalidade no período de 24 horas ocorreu com praziquantel 200 µg/ml (640,20 µM).

Tabela 30 - Viabilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades, em presença de praziquantel

Praziquantel ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a				
		Idade dos esquistossômulos (dias)				
		RT ^c	1	3	5	7
3	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
50	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
100	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
150	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
200	2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 450 esquistossômulos.

^b Em DMSO 0,2% no meio 169.

^c RT: Esquistossômulo recém-transformado.

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Experimentos semelhantes, porém examinando um repertório mais amplo de compostos (piplartina, dermaseptina 01, epiisopiloturina, piperina e grandisina) e extratos etanólicos (obtidos de *Piper tuberculatum*, *Piper crassinervium*, *Piper*

diospyrifolium, *Piper fuligineum*, *Piper gaudichaudianum* e *Pothomorphe umbellata*) foram realizados com os esquistossômulos de diferentes idades. A presença dos compostos e extratos nas culturas contendo as formas jovens de *Schistosoma* causou a morte dos parasitas, com exceção da lignana grandisina, sendo diretamente dependente da concentração, do tempo de incubação e da idade dos helmintos (Tabelas 31-41). O monitoramento, diariamente, das culturas por até 5 dias permitiu verificar que a mortalidade de 100% dos esquistossômulos de *S. mansoni* ocorreu com os compostos piplartina 2 µg/ml, dermaseptina 100 µg/ml, epiisopiloturina 300 µg/ml e piperina 100 µg/ml; e com os extratos de *Piper tuberculatum* 5 µg/ml, *P. crassinervium* 5 µg/ml, *P. diospyrifolium* 10 µg/ml, *P. fuligineum* 10 µg/ml, *P. gaudichaudianum* 20 µg/ml e *Pothomorphe umbellata* 10 µg/ml.

Considerando o efeito antiparasitário em esquistossômulos nas diferentes idades, notam-se diferenças entre os compostos e extratos. Por exemplo, no término do período de incubação, isto é, 120 horas, a mortalidade de 100% dos esquistossômulos recém-transformados e dos esquistossômulos com 7 dias de idade, foi respectivamente: piplartina 2 e 2 µg/ml; dermaseptina 150 e 100 µg/ml; epiisopiloturina 400 e 300 µg/ml; piperina 200 e 100 µg/ml; *Piper tuberculatum* 15 e 10 µg/ml, *P. crassinervium* 10 e 20 µg/ml; *P. diospyrifolium* 10 e 10 µg/ml, *P. fuligineum* 10 e 20 µg/ml, *P. gaudichaudianum* 20 e 75 µg/ml e *Pothomorphe umbellata* 20 e 10 µg/ml. A mortalidade dos esquistossômulos com diferentes idades, continuamente monitorada por até 120 horas, quando em presença dos compostos e extratos estão indicadas nas Tabelas 31-41.

Tabela 31 - Viabilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades, em presença da amida piplartina

Piplartina ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a				
		Idade dos esquistossômulos (dias)				
		RT ^c	1	3	5	7
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
5	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	72	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
10	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	72	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
20	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
25	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PZQ^d	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 450 esquistossômulos.

^b Em DMSO 0,2% no meio 169.

^c RT: Esquistossômulo recém-transformado.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 250 $\mu\text{g/ml}$).

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Tabela 32 - Viabilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades, em presença do peptídeo dermaseptina 01

Dermaseptina ($\mu\text{g/ml}$)	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a				
		Idade dos esquistossômulos (dias)				
		RT ^b	1	3	5	7
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
100	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	51,7	80,8	100,0
150	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
200	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	56,6
	96	0,0	0,0	0,0	100	100
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
250	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	96	50,0	53,3	80,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
300	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PZQ^d	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 450 esquistossômulos.

^b RT: Esquistossômulo recém-transformado.

^c Controle positivo: Praziquantel (PZQ 200 $\mu\text{g/ml}$).

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Tabela 33 - Viabilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades, em presença do alcaloide epiisopiloturina

Epiisopiloturina ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a				
		Idade dos esquistossômulos (dias)				
		RT ^c	1	3	5	7
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
300	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
350	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
400	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
500	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PZQ^d	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 450 esquistossômulos.

^b Em DMSO 0,2% no meio 169.

^c RT: Esquistossômulo recém-transformado.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 200 $\mu\text{g/ml}$).

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Tabela 34 - Viabilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades, em presença da amida piperina

Piperina ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a				
		Idade dos esquistossômulos (dias)				
		RT ^c	1	3	5	7
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
100	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	120	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
200	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
300	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	4,4	0,0	3,7
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
400	24	5,7	0,0	3,7	5,3	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
500	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PZQ^d	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 450 esquistossômulos.

^b Em DMSO 0,2% no meio 169.

^c RT: Esquistossômulo recém-transformado.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 200 $\mu\text{g/ml}$).

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Tabela 35 - Viabilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades, em presença da lignana grandisina

Grandisina ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a				
		Idade dos esquistossômulos (dias)				
		RT ^c	1	3	5	7
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1000	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1250	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
1500	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
PZQ^d	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 450 esquistossômulos.

^b Em DMSO 0,2% no meio 169.

^c RT: Esquistossômulo recém-transformado.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 200 $\mu\text{g/ml}$).

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Tabela 36 - Viabilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades, em presença do extrato de *Piper tuberculatum*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a				
		Idade dos esquistossômulos (dias)				
		RT ^c	1	3	5	7
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	100
	72	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	96	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0
	120	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0
15	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
20	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
25	24	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
30	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PZQ^d	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 450 esquistossômulos.

^b Em DMSO 0,2% no meio 169.

^c RT: Esquistossômulo recém-transformado.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 200 $\mu\text{g/ml}$).

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Tabela 37 - Viabilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades, em presença do extrato de *Piper crassinervium*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a				
		Idade dos esquistossômulos (dias)				
		RT ^c	1	3	5	7
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0
	72	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
20	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
100	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
150	24	100,0	100,0	6,2	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
200	24	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PZQ^d	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 450 esquistossômulos.

^b Em DMSO 0,2% no meio 169.

^c RT: Esquistossômulo recém-transformado.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 200 $\mu\text{g/ml}$).

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Tabela 38 - Viabilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades, em presença do extrato de *Piper diospyrifolium*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a				
		Idade dos esquistossômulos (dias)				
		RT ^c	1	3	5	7
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
20	24	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
50	24	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
100	24	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
150	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PZQ^d	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 450 esquistossômulos.

^b Em DMSO 0,2% no meio 169.

^c RT: Esquistossômulo recém-transformado.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 200 $\mu\text{g/ml}$).

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Tabela 39 - Viabilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades, em presença do extrato de *Piper fuliginum*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a				
		Idade dos esquistossômulos (dias)				
		RT ^c	1	3	5	7
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
20	24	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
30	24	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
40	24	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
50	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PZQ^d	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 450 esquistossômulos.

^b Em DMSO 0,2% no meio 169.

^c RT: Esquistossômulo recém-transformado.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 200 $\mu\text{g/ml}$).

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Tabela 40 - Viabilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades, em presença do extrato de *Piper gaudichaudianum*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a				
		Idade dos esquistossômulos (dias)				
		RT ^c	1	3	5	7
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
20	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0
50	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	100,0	100,0	0,0	0,0	0,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	0,0
75	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	8,8	0,0	0,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
100	24	100,0	100,0	100,0	0,0	0,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
150	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PZQ^d	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 450 esquistossômulos.

^b Em DMSO 0,2% no meio 169.

^c RT: Esquistossômulo recém-transformado.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 200 $\mu\text{g/ml}$).

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Tabela 41 - Viabilidade de esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades, em presença do extrato de *Pothomorphe umbellata*

Extrato ($\mu\text{g/ml}$) ^b	Tempo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a				
		Idade dos esquistossômulos (dias)				
		RT ^c	1	3	5	7
0	24	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	48	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	72	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	96	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	120	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
10	24	0,0	0,0	0,0	0,0	100,0
	48	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	72	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	96	0,0	0,0	100,0	100,0	100,0
	120	0,0	100,0	100,0	100,0	100,0
20	24	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
40	24	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
50	24	0,0	0,0	0,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
100	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	48	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	72	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	96	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
	120	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
PZQ^d	24	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

^a Porcentagem em relação a 450 esquistossômulos.

^b Em DMSO 0,2% no meio 169.

^c RT: Esquistossômulo recém-transformado.

^d Controle positivo: Praziquantel (PZQ 200 $\mu\text{g/ml}$).

Os valores correspondem a três experimentos feitos em triplicatas.

Diferenças na atividade de compostos em esquistossômulos de diferentes idades foram assinaladas na literatura. Xiao, Mei e Jiao (2009) avaliaram, *in vitro*, o efeito da mefloquina, um aminoálcool antimalárico, em *Schistosoma japonicum*. No caso, os autores verificaram que os esquistossômulos com 3 horas foram mais susceptíveis que parasitas com 7 dias, apresentando efeito letal com mefloquina 5 µg/ml e 10 µg/ml, respectivamente. Nos experimentos realizados neste trabalho empregando esquistossômulos de *S. mansoni* (recém-transformado, 1, 3, 5 e 7 dias de idade), os helmintos mais novos são mais susceptíveis quando expostos aos extratos de *Piper crassinervium*, *P. fuligineum* e *P. gaudichaudianum*; enquanto que os esquistossômulos mais velhos são mais susceptíveis aos compostos pipartina, dermaseptina, epiisopiloturina e grandisina, assim como os extratos de *Piper tuberculatum*, *Piper diospyrifolium* e *Pothomorphe umbellata*.

Com relação aos esquistossômulos com diferentes idades, devem-se ressaltar alguns aspectos biológicos nos primeiros dias de idade. O esquistossômulo é a forma capaz de migrar pelos tecidos e vasos do hospedeiro mamífero, tendo capacidade imunogênica e sendo, também, um alvo de defesas específicas do hospedeiro (WILSON et al., 1978, 1990; MILLER e WILSON, 1978; WILSON e COULSON, 1986; WILSON; COULSON; DIXON, 1986; CAPRON, 1992; PEARCE e SHER, 1987; GOBERT; CHAI; MCMANUS, 2007). Até atingirem a maturidade sexual (após 35 dias), os esquistossomos passam por diversas mudanças fisiológicas e morfológicas. Em *S. mansoni*, entre uma e três horas após a penetração das cercárias na pele do hospedeiro, um aumento na temperatura e na osmolaridade inicia uma série de adaptações, que rapidamente preparam os parasitas para sobreviverem ao novo ambiente. Em apenas uma hora, a maior parte do glicocálix é perdida e o tegumento começa a se converter de uma estrutura trilaminada para uma estrutura heptalaminada (STIREWALT, 1974; SKELLY e ALAN WILSON, 2006; GOBERT; CHAI; MCMANUS, 2007). Com 3 horas, membrana externa já é heptalaminada e o tegumento contém grandes vacúolos e pequenos corpos membranosos. Nos esquistossômulos de 24 horas ocorre a formação de pregas e cavidades na superfície, além da regulação da proteína de choque térmico (HSP 70) (HOCKLEY, 1973; HOCKLEY e MCLAREN, 1973; STIREWALT, 1974, BLANTON e LICATE, 1992). A transformação torna o tubo digestivo funcional, com diversas vesículas ricas em fosfatase ácida. Além disso, diversas glicoproteínas são encontradas nessa fase parasitária, com mudanças na expressão de acordo com a idade do parasita (WILSON et al., 1978; AURIAULT et al., 1982; CARNEIRO-SANTOS et al., 2001). Após o segundo dia, as glândulas acetabulares e seus ductos desaparecem, o que caracteriza a real transformação de cercárias em esquistossômulo. A partir desse período se inicia o processo de alongamento dos esquistossômulos, e começa ocorrer regressão dos espinhos tegumentares na parte central do corpo, mantendo-se, contudo, nas

extremidades anterior e posterior (CRABTREE e WILSON, 1980). Em torno de 72 horas, a região central do corpo torna-se quase totalmente despida de espinhos e o tegumento fica repleto de pequenas covas. Os espinhos não são mais visualizados em torno de 96 horas (CRABTREE e WILSON, 1980). Após o quarto dia, os esquistossômulos perdem a camada intersticial fibrosa subtegumentar e parte da musculatura anterior; o tegumento continua com pequenas covas e, dependendo do grau de extensão corporal, exhibe pregas e sulcos. Após o quinto dia, o tegumento torna-se mais espesso e os parasitas chegam a ultrapassar, em até quatro vezes, o comprimento dos helmintos dos dois dias anteriores; o tubo digestivo também apresenta-se mais desenvolvido e a partir dessa fase ocorrem mudanças para formação desse tubo digestivo: ceco com pigmento e bifurcação (WILSON et al., 1978; CRABTREE e WILSON, 1980). Do ponto de vista bioquímico, inúmeras peptidases já foram descritas em diferentes fases de desenvolvimento do *S. mansoni*. Muitas dessas enzimas estão associadas ao tegumento do esquistossômulo e estariam envolvidas no mecanismo de proteção do parasita contra a resposta protetora do hospedeiro (AURIAULT et al., 1981, 1982; DAMONEVILLE et al., 1982). Além disso, a superfície dos esquistossômulos é dinâmica, com expressão de diferentes proteínas, muitas de forma alternada, nessa fase jovem de *S. mansoni* (PAYARES et al., 1985).

Dessa forma, considerando as mudanças morfológicas e fisiológicas nas diferentes fases dos esquistossômulos, associadas às características peculiares dos compostos e extratos vegetais, esperávamos, de fato, as diferenças na susceptibilidade entre os esquistossômulos (recém-tranformados e com 1, 3, 5 e 7 dias de idade) quando expostos aos produtos naturais (Tabelas 31-41).

Como já citado neste estudo, diversos trabalhos relatam produtos naturais em *Schistosoma mansoni*. Por outro lado, o efeito esquistossomicida desses produtos nas formas jovens (esquistossômulos) foi pouco assinalado na literatura. Na terapêutica experimental da esquistossomose, somente os derivados de artemisina, especialmente o arteméter e o artenusado, apresentam características profiláticas, atuando nos esquistossômulos (XIAO et al. 2002; UTZINGER et al., 2001a, 2001b). Entretanto, esses compostos são mais eficazes na forma adulto-jovem (21 dias de idade), e apresentam baixa atividade em esquistossômulos (5 e 7 dias de idade) e vermes adultos (SHUHUA et al., 2000; XIAO et al., 2002). Desta forma, para atingir diferentes formas do parasita a associação de arteméter e praziquantel vem sendo empregada em alguns estudos (XIAO et al. 2002; UTZINGER et al., 2001a, 2001b, 2003). Apesar de haver diminuição significativa da carga parasitária com esta associação, sendo, inclusive, maior do que a obtida com o praziquantel isoladamente (UTZINGER et al., 2003), o uso contínuo e prolongado dos derivados de artemisina traz preocupações em áreas endêmicas para

malária, pois existe a possibilidade do aparecimento de resistência a essas drogas (UTZINGER et al., 2003; KATZ et al., 2008).

Nesse contexto, a busca por drogas com características, concomitante, curativas e profiláticas tem aumentado. Recentemente, Boissier et al. (2009) mostraram que as trioxaquinas, composto antimalárico sintetizado de artemisina, apresentam efeito in vitro em adultos (49 dias) e adultos-jovens (21 dias) de *S. mansoni*, nas concentrações de 50 µg/ml e 5 µg/ml, respectivamente; no entanto, os autores não avaliaram os efeitos desses compostos em parasitas mais novos, por exemplo, até 7 dias. Em estudos in vitro para avaliar a toxicidade de ácido aracdônico em *S. mansoni*, El Ridi et al. (2010) assinalaram efeito helminticida em esquistossômulos (7 dias) e vermes adultos (42 dias) nas concentrações, de ácido aracdônico, iguais ou superiores a 5.000 µM. Manneck, Haggemüller e Keiser (2010) relataram, in vitro, que alguns isômeros de mefloquina são tóxicos para esquistossômulos de *S. mansoni* nas concentrações de 3 µg/ml a 10 µg/ml, enquanto que a ação letal para adultos foi com 10 µg/ml.

No geral, no presente estudo, considerando a concentração dos 5 compostos e 6 extratos naturais ensaiados, a análise dos experimentos indicou que esquistossômulos de *Schistosoma mansoni* são mais susceptíveis aos compostos piplartina e dermaseptina, e ao extrato etanólicos obtido de folhas de *Piper diospyrifolium*. Além disso, comparativamente, o efeito esquistossomicida observado com os compostos ou extratos ocorreu em concentrações menores do que o controle positivo (praziquantel 150-200 µg/ml); sendo exceções: epiisopiloturina e piperina. As concentrações mínimas dos compostos e extratos capazes de matar 100% dos parasitas, independentemente do tempo de incubação, estão listadas na Tabela 42.

Tabela 42 - Concentração mínima de compostos e extratos capaz de causar efeito esquistossomicida em 100% dos esquistossômulos de *Schistosoma mansoni*

Compostos/Extratos ^a	Idade dos esquistossômulos													
	RT ^c			1 dia			3 dias			5 dias			7 dias	
	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM
Piplotartina	2	6,40	2	6,40	2	6,40	2	6,40	2	6,40	2	6,40	2	6,40
Dermaseptina	150	53,69	150	53,69	150	53,69	150	53,69	150	53,69	150	53,69	100	35,79
Piperina	200	700,97	200	700,97	200	700,97	200	700,97	100	350,48	100	350,48	100	350,48
Episopiloturina	400	1.398,6	400	1.398,6	400	1.398,6	350	1.223,78	350	1.223,78	300	1.048,95	300	1.048,95
Grandisina	NE ^d	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
<i>Piper diospyrifolium</i>	10	---	10	---	10	---	10	---	10	---	10	---	20	---
<i>Piper crassinervium</i>	10	---	10	---	10	---	10	---	10	---	10	---	20	---
<i>Piper fuligineum</i>	10	---	10	---	10	---	10	---	10	---	10	---	20	---
<i>Piper tuberculatum</i>	15	---	15	---	10	---	10	---	10	---	10	---	10	---
<i>Pothomorphe umbellata</i>	20	---	10	---	10	---	10	---	10	---	10	---	10	---
<i>Piper gaudichaudianum</i>	20	---	20	---	50	---	50	---	50	---	75	---	75	---
PZQ ^b	150	480,15	150	480,15	150	480,15	150	480,15	150	480,15	150	480,15	150	480,15

Os esquistossômulos de *S. mansoni* foram incubados no meio 169 contendo diferentes concentrações de extratos ou compostos. Os parasitas foram monitorados diariamente por até 5 dias.

^a Em DMSO 0,2% no meio 169; exceção ao peptídeo dermaseptina 01 no qual foi dissolvido direto no meio 169.

^b Controle positivo: Praziquantel (PZQ).

^c RT: Esquistossômulo recém-transformado.

^d NE: Valor não encontrado até a concentração máxima avaliada, isto é, 1.500 µg/ml (3468,15 µM).

* Concentração avaliada em 450 esquistossômulos.

Os valores correspondem a, pelo menos, três experimentos independentes feitos em triplicatas.

A transformação das cercárias em esquistossômulos pode ser conseguida *in vitro* por alguns métodos mecânicos, já assinalados em trabalhos da década de 1970. Os mais comumente empregados são: a) agitação da suspensão de cercárias em um agitador de tubos, tipo vortex (RAMALHO-PINTO et al., 1974); b) a passagem da cercária, sob pressão, através de uma agulha de pequeno calibre (COLLEY e WIKEL, 1974). Neste estudo foi utilizada a metodologia descrita por Ramalho-Pinto et al. (1974), tendo em vista que essa é a mais recomendada, muito provavelmente devido à sua simplicidade (RAMIREZ et al., 2007; KEISER et al., 2010). Além disso, segundo Alan Wilson, 2010 (comunicação pessoal; University of York, York, United Kingdom), a transformação mecânica em agitador seria menos estressante do que a passagem dos parasitas, sob pressão, através de uma agulha por repetidas vezes.

Outro aspecto relevante para os ensaios biológicos com as formas jovens de esquistossomos antes do cultivo *in vitro*, as cercárias mecanicamente transformadas em esquistossômulos foram incubadas por 3 horas a 37 °C, em atmosfera de CO₂ a 5%. Dessa forma, os parasitas recém-transformados têm 3 horas de idade (CURWEN et al., 2006). Esse período de incubação previamente aos ensaios para avaliar a atividade de compostos e extratos vegetais em esquistossômulos é importante para a adaptação à vida parasitária, que consiste no esvaziamento das glândulas acetabulares e remoção do glicocálix, além de aumentar a área da superfície da membrana plasmática, possibilitando maior absorção ou secreção de material (GAZZINELLI et al., 1973, 1974; HOCKLEY e MACLAREN, 1973; HOWELLS et al., 1974, 1975; RAMALHO-PINTO et al., 1974; STIREWALT, 1974; MCKERROW, 1989; MCKERROW e SALTER, 2002; SKELLY e ALAN WILSON, 2006).

In vivo, os parasitas apresentam características biológicas diferentes dos helmintos mantidos *in vitro*. Entretanto, neste estudo, a idade dos esquistossômulos foi contada *in vitro* devido à dificuldade de se retirar essa forma parasitária do hospedeiro. Além disso, obter quantidades suficientes de esquistossômulos diretamente do tecido da pele e do pulmão para fins de investigação é demorado, tem baixo rendimento e envolve o trabalho com muitos mamíferos (GOBERT et al., 2010). Dessa forma, muitos pesquisadores utilizam cercárias mecanicamente transformadas e mantêm os parasitas em meio de cultura. Essa estratégia *in vitro* também confere uniformidade na maturação do parasita, o que não pode ser alcançado *in vivo* devido à variação no tempo necessário de permanência no tecido e migração pelos vasos sanguíneos (GOBERT et al., 2010). Além disso, esquistossômulos com diferentes idades *in vitro* são amplamente usados nos ensaios biológicos, preservando sua capacidade de maturação após introdução no hospedeiro, sendo equivalente morfológica e fisiologicamente a idade *in vivo* (BASCH, 1981a, 1981b; BASCH e HUMBERT, 1981; HARROP e WILSON, 1993; BRITO et al., 2002; DILON et al., 2006).

Estudos em *Schistosoma mansoni*, com diferentes idades (5, 7, 14, 21, 28, 35 e 42 dias), expostos ao arteméter apresentaram resultados interessantes: a mortalidade é baixa nos parasitas com 5 e 7 dias de idade, com um aumento gradual na idade de 14 dias, e atinge alta mortalidade nos parasitas com 21 e 28 dias; nas idades subsequentes (35 e 42 dias) houve redução da taxa de mortalidade (SHUHUA et al., 2000b; XIAO et al., 2002). Apesar de ser comumente empregado em alguns países asiáticos, o mecanismo pelo qual o arteméter apresenta alta eficácia somente nos parasitas com 3 a 4 semanas ainda é desconhecido (XIAO et al., 2002; UTZINGER et al., 2001a, 2001b).

Em nosso estudo, os resultados de experimentos com vermes adultos e esquistossômulos permitiram constatar que os compostos e extratos apresentaram atividade biológica diretamente dependente da concentração e do tempo de incubação. Comparativamente, no geral, a concentração mínima capaz de matar 100% dos parasitas difere entre esquistossômulos e adultos. Por exemplo, a mortalidade de todos os helmintos recém transformados (3 horas), com 7 dias de idade e adultos (machos e fêmeas, com 49 dias) em presença do peptídeo dermaseptina foi obtida com as concentrações de 150 µg/ml, 100 µg/ml e 50 µg/ml, respectivamente. Por outro lado, 10 µg/ml do extrato de *Piper diospyrifolium* foram suficientes para causar efeito anti-helmintos em todos os esquistossômulos, e somente quando a concentração é aumentada para 50 µg/ml, a mortalidade de 100% em parasitas adultos é atingida. A Tabela 43 apresenta um resumo das concentrações de compostos e extratos que causam a mortalidade de 100% dos parasitas recém transformados, 7 dias e 49 dias de idade.

Tabela 43 - **Concentração mínima de compostos e extratos capaz de causar efeito esquistossomicida em todos os esquistossômulos (recém-transformados e 7 dias de idade) e adultos (machos e fêmeas, com 49 dias) de *Schistosoma mansoni***
Concentração mínima capaz de matar 100% dos parasitas*

Compostos/Extratos ^a	Idade dos parasitas							
	Esquistossômulos				Fêmeas			
	7 dias		49 dias		7 dias		49 dias	
RT ^c	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM	µg/ml	µM
Piplartina	2	6,40	2	6,40	3	9,45	3	9,45
Dermaseptina	150	53,69	100	35,79	50	17,89	50	17,89
Piperina	200	700,97	100	350,48	300	1.051,45	300	1.051,45
Episopiloturina	400	1.398,6	300	1.048,95	150	524,57	150	524,47
Grandisina	NE ^d	NE	NE	NE	900	2.080,89	900	2.080,89
<i>Piper diospyrifolium</i>	10	---	10	---	50	---	50	---
<i>Piper crassinervium</i>	10	---	20	---	50	---	50	---
<i>Piper fulgieneum</i>	10	---	20	---	50	---	40	---
<i>Piper tuberculatum</i>	15	---	10	---	4	---	4	---
<i>Pothomorphe umbellata</i>	20	---	10	---	30	---	40	---
<i>Piper gaudichaudianum</i>	20	---	75	---	50	---	75	---
PZQ ^b	150	480,15	150	480,15	150	480,15	150	480,15

Os esquistossômulos e adultos de *S. mansoni* foram incubados no meio 169 e RPMI, respectivamente, contendo diferentes concentrações de extratos ou compostos. Os parasitas foram monitorados diariamente por até 5 dias.

^a Em DMSO 0,2% no meio 169 ou meio RPMI; exceção ao peptídeo dermaseptina 01 no qual foi dissolvido direto no meio de cultura.

^b Controle positivo: Praziquantel (PZQ).

^c RT: Esquistossômulo recém-transformado.

^d NE: Valor não encontrado até a concentração máxima avaliada, isto é, 1.500 µg/ml (3468,15 µM).

* Concentração avaliada em 450 esquistossômulos, e pelo menos, 20 vermes adultos.

Os valores correspondem a, pelo menos, três experimentos independentes feitos em triplicatas.

5.4.2 Alterações no tegumento de esquistossômulos, com diferentes idades, em presença de compostos e extratos

Além do efeito letal em esquistossômulos de *S. mansoni*, durante o monitoramento microscópico das culturas foi possível também notar que os compostos e extratos causaram a contração nos esquistossômulos, independentemente da idade, previamente ao efeito antiparasitário. Esse encurtamento dos helmintos foi dependente da concentração e mais notadamente com os compostos piplartina e piperina, e com todos os extratos. Por outro lado, o praziquantel, usado aqui como controle positivo na concentração de 150 µg/ml, não causou a contração dos esquistossômulos antes da ação letal.

Não obstante a contração muscular observada com microscopia de luz, em técnica de campo claro, uma análise mais detalhada foi realizada nos esquistossômulos expostos aos compostos e extratos. Nos experimentos, após o término do período de incubação (120 horas) ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e analisados por microscopia confocal. Comparativamente aos controles contendo somente meio de cultura ou praziquantel, nas concentrações letais notou-se alterações morfológicas em todos os parasitas. Os danos no tegumento foram dependentes da idade dos esquistossômulos e da concentração dos compostos e extratos ensaiados (Figuras 34-37 e dados não mostrados).

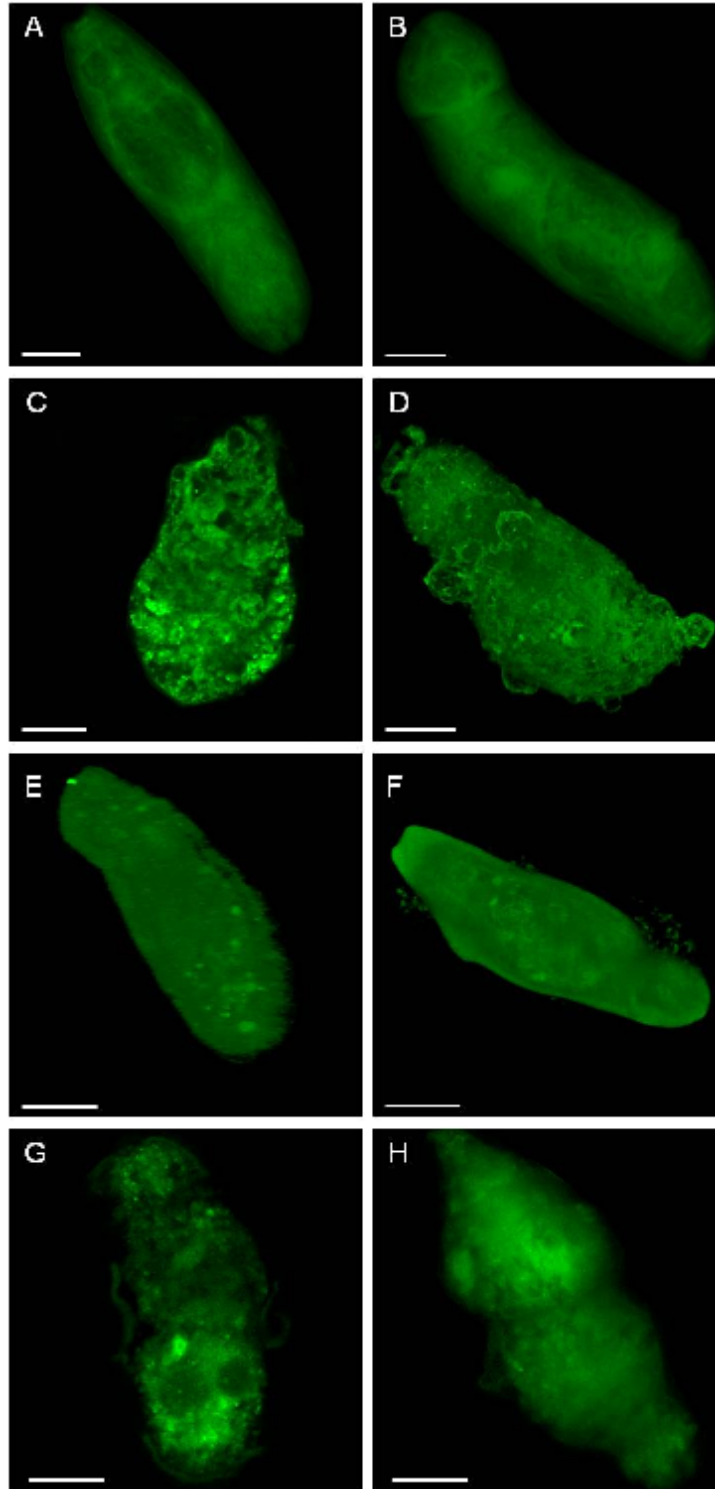


Figura 34. **Efeito da piplartina, dermaseptina 01 e piperina nos esquistossômulos, recém transformados (A, C, E e G) e sete dias de idade (B, D, F e H), de *Schistosoma mansoni*.** Os esquistossômulos foram incubados em meio 169 contendo os compostos. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscopia confocal. **A e B:** controle, sem adição de composto, após 120 horas. **C e D:** piplartina 25 µg/ml, após 24 horas. **E e F:** dermaseptina 300 µg/ml, após 24 horas. **G e H:** piperina 400 µg/ml, após 48 horas. A-H: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 25 µm.

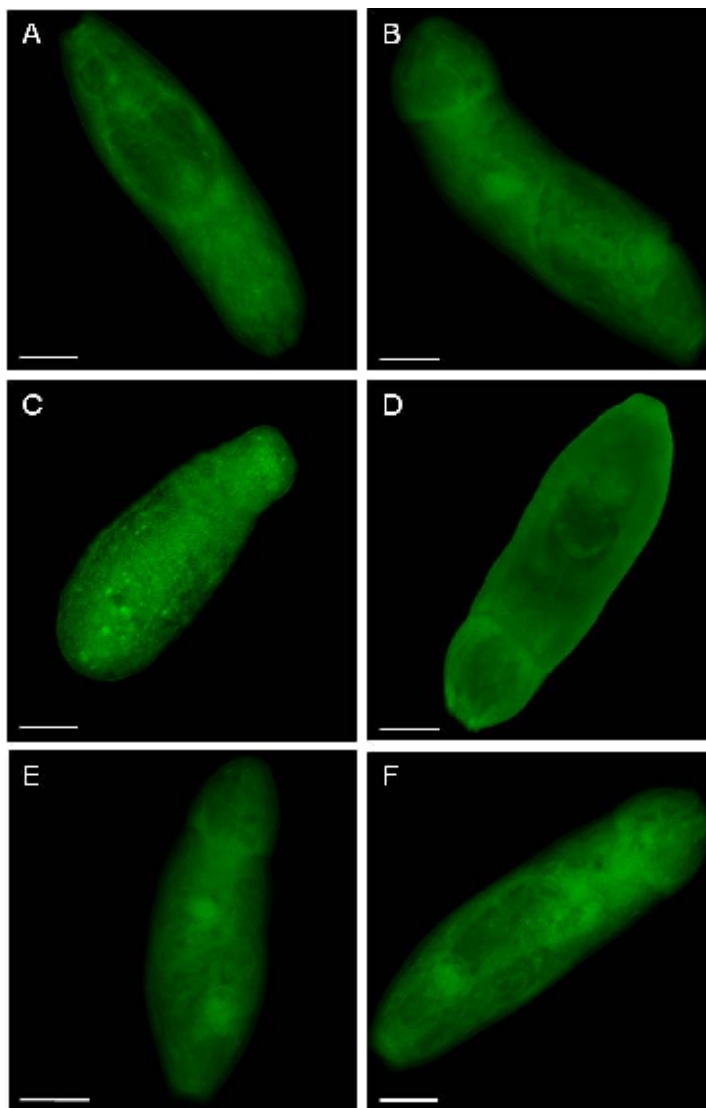


Figura 35. **Efeito da epiisopiloturina e grandisina nos esquistossômulos, recém transformados (A, C, e E) e sete dias de idade (B, D e F), de *Schistosoma mansoni*.** Os esquistossômulos foram incubados em meio 169 contendo os compostos. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscopia confocal. **A e B:** controle, sem adição de composto, após 120 horas. **C e D:** epiisopiloturina 400 µg/ml, após 96 horas. **E e F:** grandisina 1000 µg/ml, após 120 horas. A-F: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 25 µm.

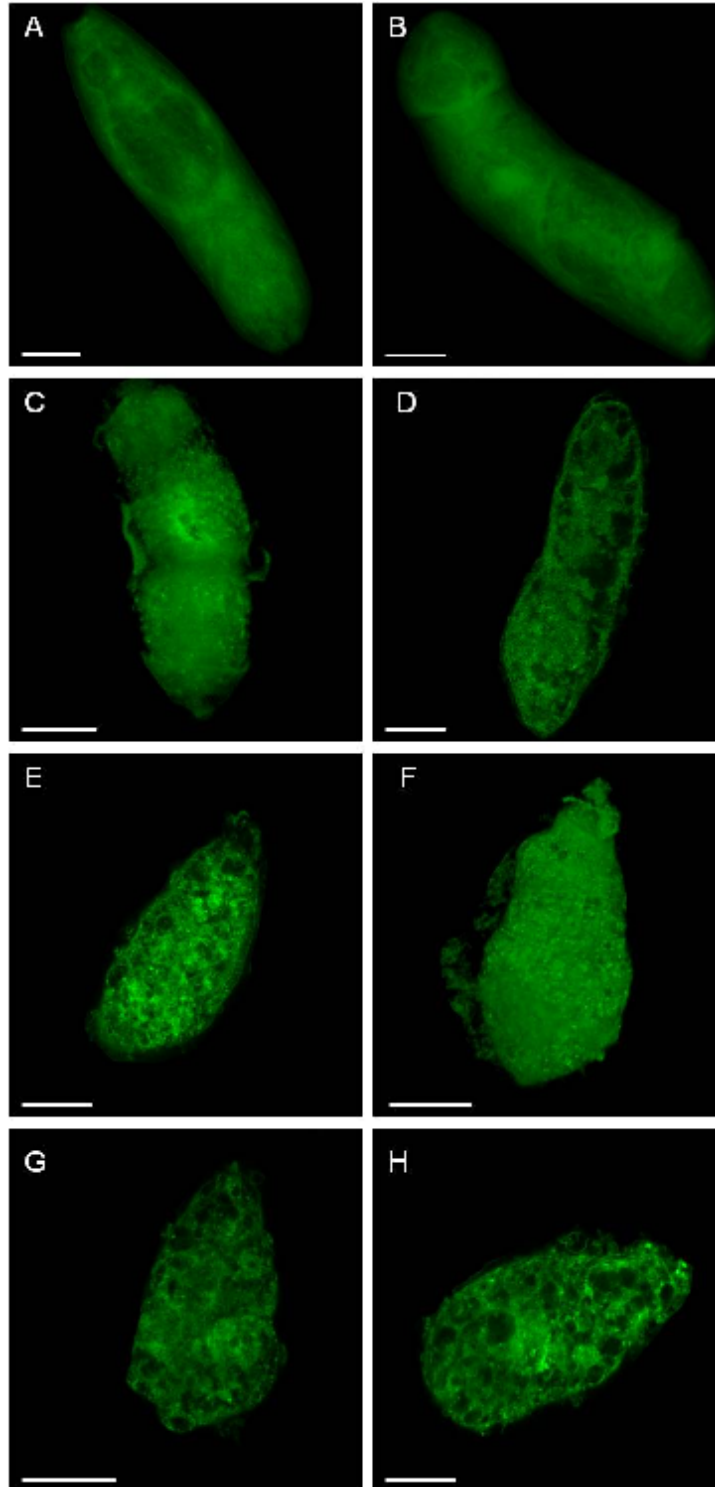


Figura 36. Efeito dos extratos de *Piper tuberculatum*, *Piper crassinervium* e *Piper diospyrifolium* nos esquistossômulos, recém transformados (A, C, E e G) e sete dias de idade (B, D, F e H), de *Schistosoma mansoni*. Os esquistossômulos foram incubados em meio 169 contendo os extratos. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscopia confocal. A e B: controle, sem adição de extrato, após 120 horas. C e D: *P. tuberculatum* 30 µg/ml, após 24 horas. E e F: *P. crassinervium* 200 µg/ml, após 24 horas. G e H: *Piper diospyrifolium* 100 µg/ml, após 48 horas. A-H: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 25 µm.

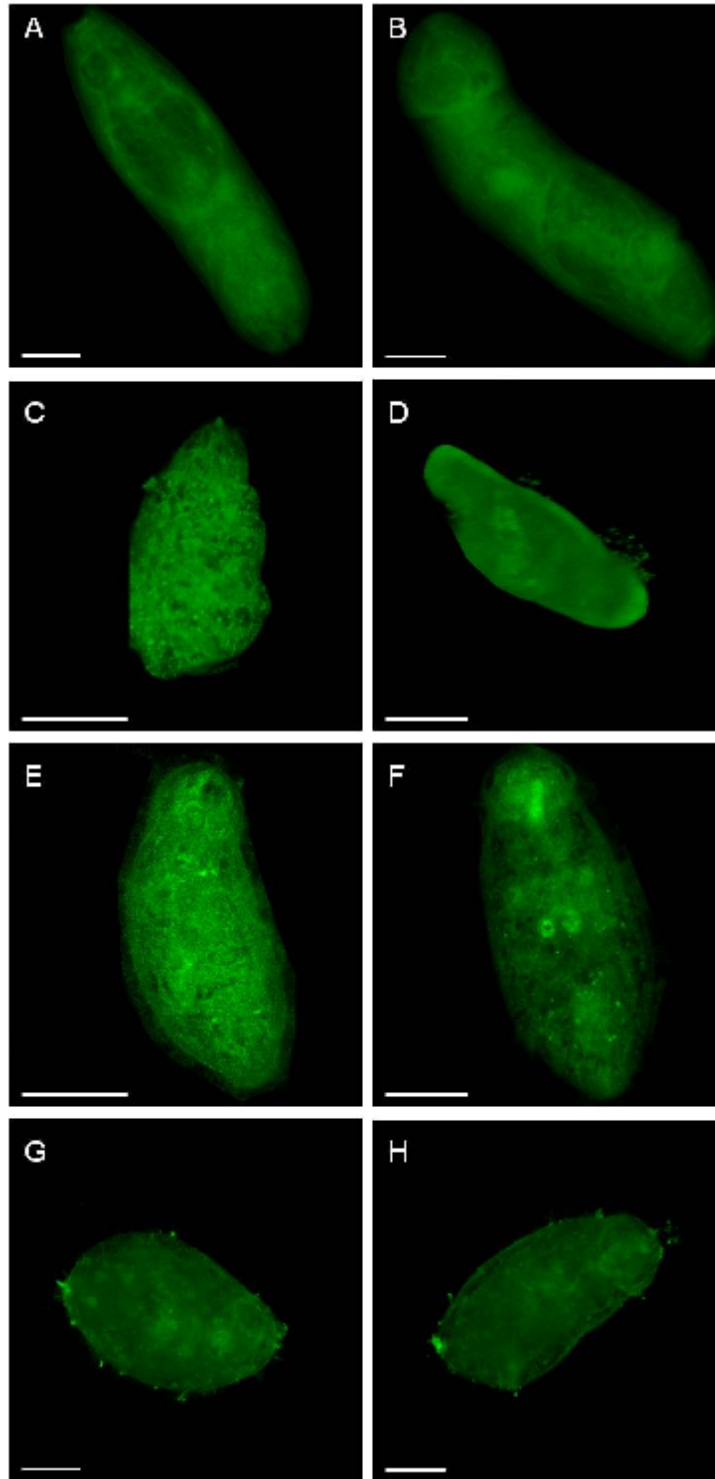


Figura 37. Efeito dos extratos de *Piper fuliginum*, *Piper gaudichaudianum* e *Pothomorphe umbellata* nos esquistossômulos, recém transformados (A, C, E e G) e sete dias de idade (B, D, F e H), de *Schistosoma mansoni*. Os esquistossômulos foram incubados em meio 169 contendo os extratos. Após 120 horas ou ocorrência de morte, os parasitas foram fixados em solução AFA e monitorados com microscopia confocal. A e B: controle, sem adição de extrato, após 120 horas. C e D: *P. fuliginum* 50 µg/ml, após 24 horas. E e F: *P. gaudichaudianum* 150 µg/ml, após 24 horas. G e H: *P. umbellata* 100 µg/ml, após 24 horas. A-H: Imagens tridimensionais capturadas de microscópio confocal. Barras = 25 µm.

A partir da penetração no hospedeiro mamífero, o tegumento do esquistossômulo se torna especializado para absorção, secreção e proteção do parasita. De fato, o esquistossômulo precisa se deslocar pelos tecidos e vasos do hospedeiro e não parece haver contestações de que esse deslocamento requer que os esquistossômulos vençam barreiras (MCKERROW e SALTER, 2002; CURWEN e WILSON, 2003). Assim como no verme adulto, o tegumento do esquistossômulo é um importante alvo para drogas. Durante estudos *in vitro* com *Schistosoma japonicum* expostos a mefloquina, a análise por microscopia de luz indicou que os parasitas com 3 horas e 7 dias de idade sofrem alterações no tegumento: pequenas bolhas e/ou superfície rugosa (XIAO; MEI; JIAO, 2009). Como apresentado em neste estudo, a análise por microscopia confocal mostrou que os compostos e extratos causaram alterações no tegumento dos esquistossômulos, com bolhas e rugosidade na superfície, de acordo com as observações de Xiao, Mei e Jiao (2009).

5.5 Toxicidade de compostos e extratos em células de mamífero

Os extratos e compostos naturais utilizados neste estudo apresentaram atividade em vermes adultos e esquistossômulos de *S. mansoni*. O objetivo desta parte do trabalho foi avaliar a toxicidade dos compostos e extratos vegetais em célula de mamífero, utilizando células Vero (linhagem celular de rim de macaco), um modelo experimental para estudos de citotoxicidade (MCCLANE et al., 1984; EKWALL et al., 1990; BHUNIA e WAMPLER, 2005).

A viabilidade celular foi avaliada utilizando o método por cristal violeta (CRUZ; MENDONÇA; PETRICEVICH, 2005). Nos experimentos, as células Vero foram cultivadas em placas de cultura de 96 poços contendo compostos ou extratos em meio DMEM suplementado com 10% de soro a 37 °C, em atmosfera de CO₂ a 5%. Após 24, 48 e 72 horas, os sobrenadantes eram retirados e as células aderidas foram fixadas e coradas com cristal violeta 0,2% em metanol 20%. A toxicidade era avaliada a partir da absorbância de poços controles, contendo células em meio DMEM com DMSO 0,2%. Durante o todo o período de incubação as culturas foram monitoradas, diariamente, em microscópio invertido.

5.5.1 Atividade citotóxica de compostos e extratos vegetais em células Vero

Os resultados consolidados de pelo menos de três experimentos independentes, nos quais a toxicidade foi avaliada simultaneamente com todos os compostos e extratos vegetais, revelam que a toxicidade em células Vero foi dependente da concentração e dos produtos naturais ensaiados. As Figuras 38-43 apresentam os resultados da viabilidade das células Vero em presença de compostos e extratos, a diferentes concentrações, durante 24 h, 48 h e 72 h de incubação. Comparativamente às células incubadas apenas em meio de cultura, no término de período de incubação, isto é, 72 horas a redução da viabilidade celular foi significativa com o praziquantel 150 µg/ml (P < 0,001), com os compostos pipartina 25 µg/ml (P < 0,05), grandisina 1750 µg/ml (P < 0,05), bem como com os extratos de *Piper tuberculatum* 30 µg/ml (P < 0,001), *Piper crassinervium* 150 µg/ml (P < 0,05), *Piper diospyrifolium* 300 µg/ml (P < 0,01) e *Piper gaudichaudianum* 500 µg/ml (P < 0,05). Por outro lado, os compostos piperina, dermaseptina e epiisopiloturina, assim como os extratos de folhas de *Piper fuliginum* e *Pothomorphe umbellata* não apresentaram citotoxicidade nas concentrações avaliadas (Figuras 38-43).

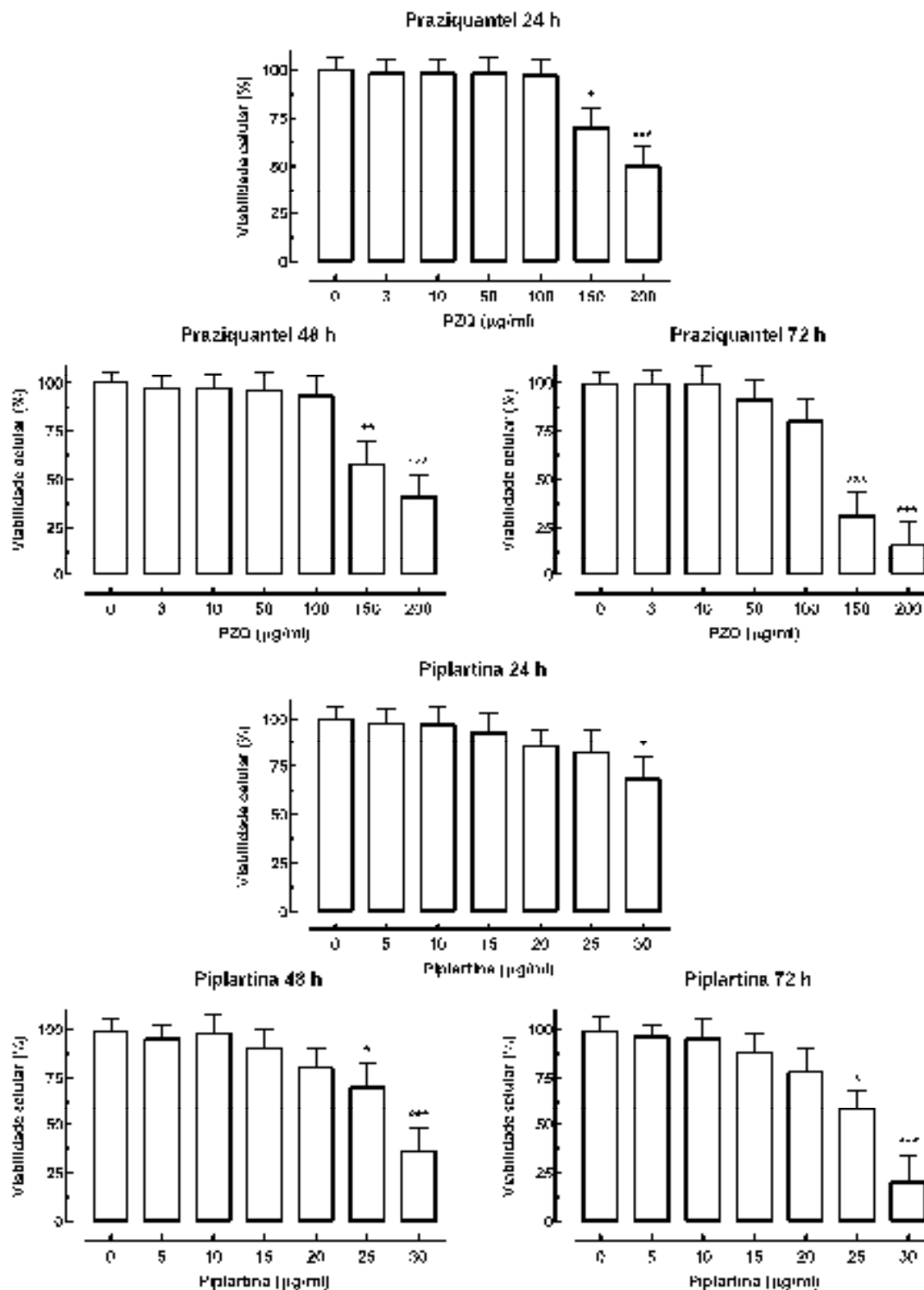


Figura 38. **Viabilidade da célula Vero em presença de praziquantel e piplartina.** As células foram crescidas em meio DMEM, contendo DMSO 0,2%, em presença dos compostos nos tempos e concentrações indicadas. Após diferentes tempos, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta em metanol. A viabilidade celular foi avaliada a partir da leitura das absorvâncias (595 nm). Os valores são média de três experimentos independentes feitos em triplicatas. As barras representam o desvio padrão da média. Diferença significativa entre o controle (DMEM contendo DMSO 0,2%) e os grupos tratados com praziquantel (PZQ) e piplartina: *($P < 0,05$), **($P < 0,01$), ***($P < 0,001$).

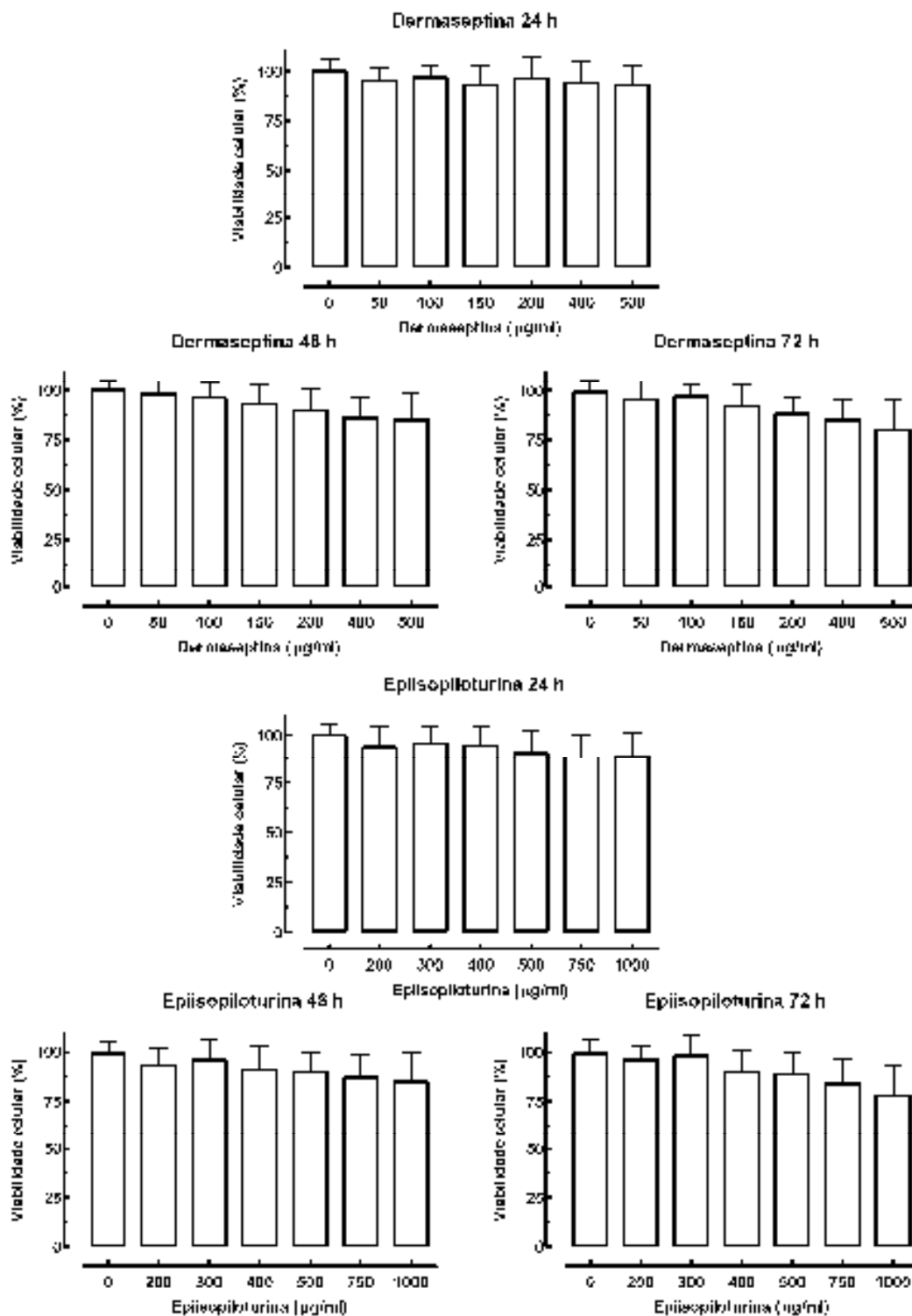


Figura 39. **Viabilidade da célula Vero em presença de Dermaseptina 01 e episopiloturina.** As células foram crescidas em meio DMEM, contendo DMSO 0,2%, em presença dos compostos nos tempos e concentrações indicadas. Após diferentes tempos, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta em metanol. A viabilidade celular foi avaliada a partir da leitura das absorvâncias (595 nm). Os valores são média de três experimentos independentes feitos em triplicatas. As barras representam o desvio padrão da média.

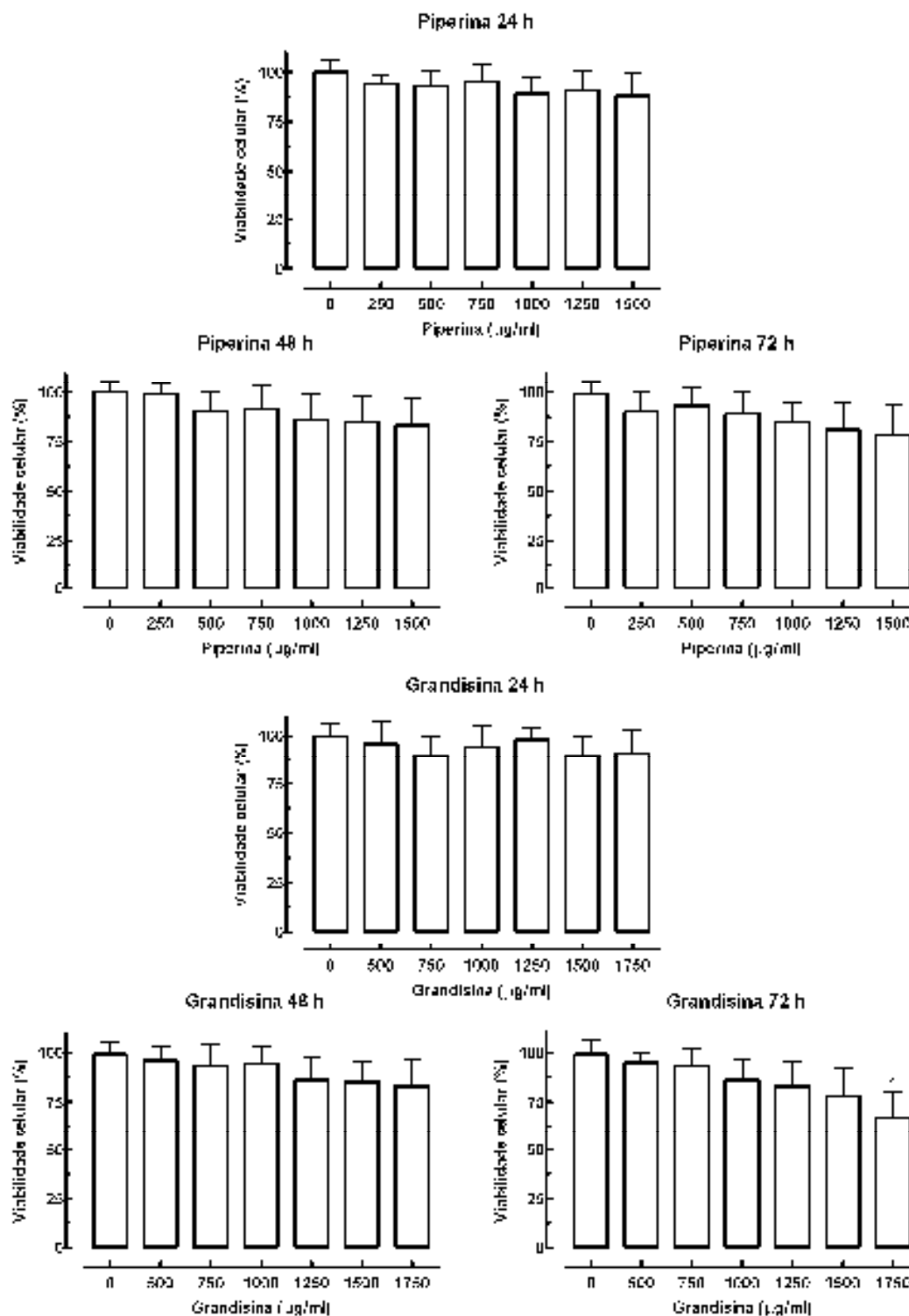


Figura 40. **Viabilidade da célula Vero em presença de piperina e grandisina.** As células foram crescidas em meio DMEM, contendo DMSO 0,2%, em presença dos compostos nos tempos e concentrações indicadas. Após diferentes tempos, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta em metanol. A viabilidade celular foi avaliada a partir da leitura das absorvâncias (595 nm). Os valores são média de três experimentos independentes feitos em triplicatas. As barras representam o desvio padrão da média. Diferença significativa entre o controle (DMEM contendo DMSO 0,2%) e os grupos tratados com grandisina: *($P < 0,05$).

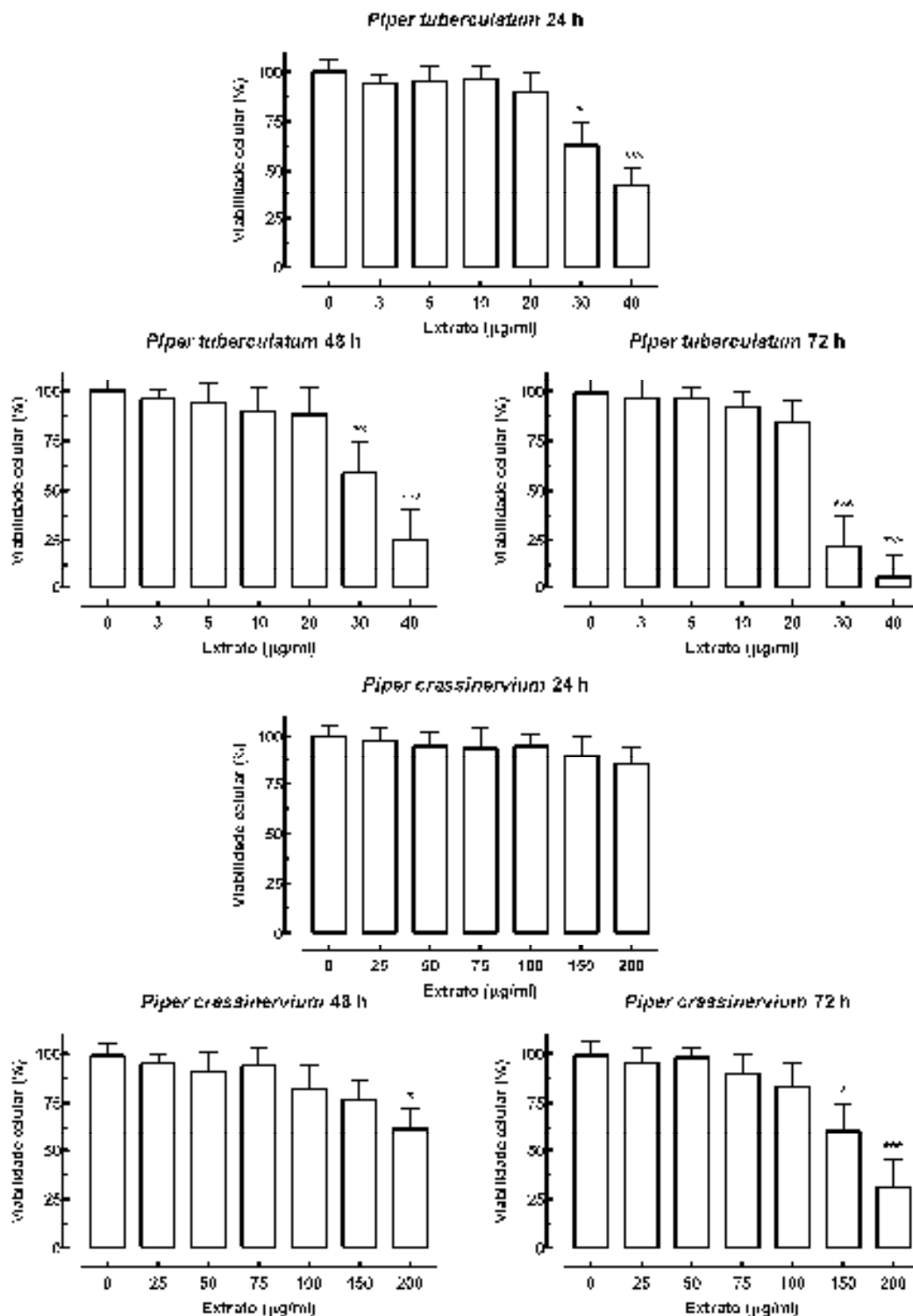


Figura 41. **Viabilidade da célula Vero em presença de extratos de *Piper tuberculatum* e *Piper crassinervium*.** As células foram crescidas em meio DMEM, contendo DMSO 0,2%, em presença dos extratos nos tempos e concentrações indicadas. Após diferentes tempos, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta em metanol. A viabilidade celular foi avaliada a partir da leitura das absorbâncias (595 nm). Os valores são média de três experimentos independentes feitos em triplicatas. As barras representam o desvio padrão da média. Diferença significativa entre o controle (DMEM contendo DMSO 0,2%) e os grupos tratados com extratos vegetais: *($P < 0,05$), **($P < 0,01$), ***($P < 0,001$).

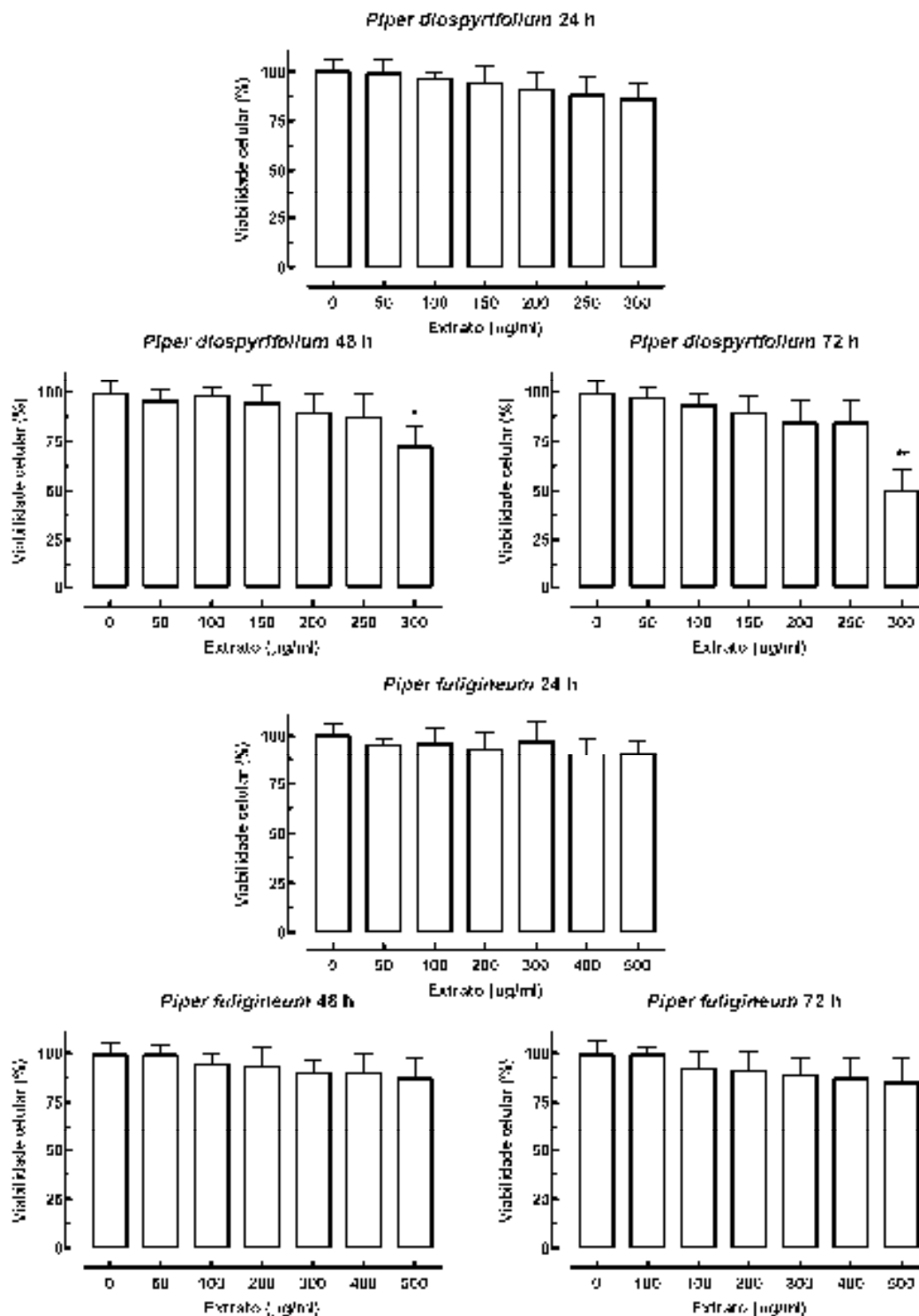


Figura 42. **Viabilidade da célula Vero em presença de extratos de *Piper diospyrifolium* e *Piper fuligininum*.** As células foram crescidas em meio DMEM, contendo DMSO 0,2%, em presença dos extratos nos tempos e concentrações indicadas. Após diferentes tempos, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta em metanol. A viabilidade celular foi avaliada a partir da leitura das absorbâncias (595 nm). Os valores são média de três experimentos independentes feitos em triplicatas. As barras representam o desvio padrão da média. Diferença significativa entre o controle (DMEM contendo DMSO 0,2%) e os grupos tratados com extratos vegetais: *($P < 0,05$), **($P < 0,01$).

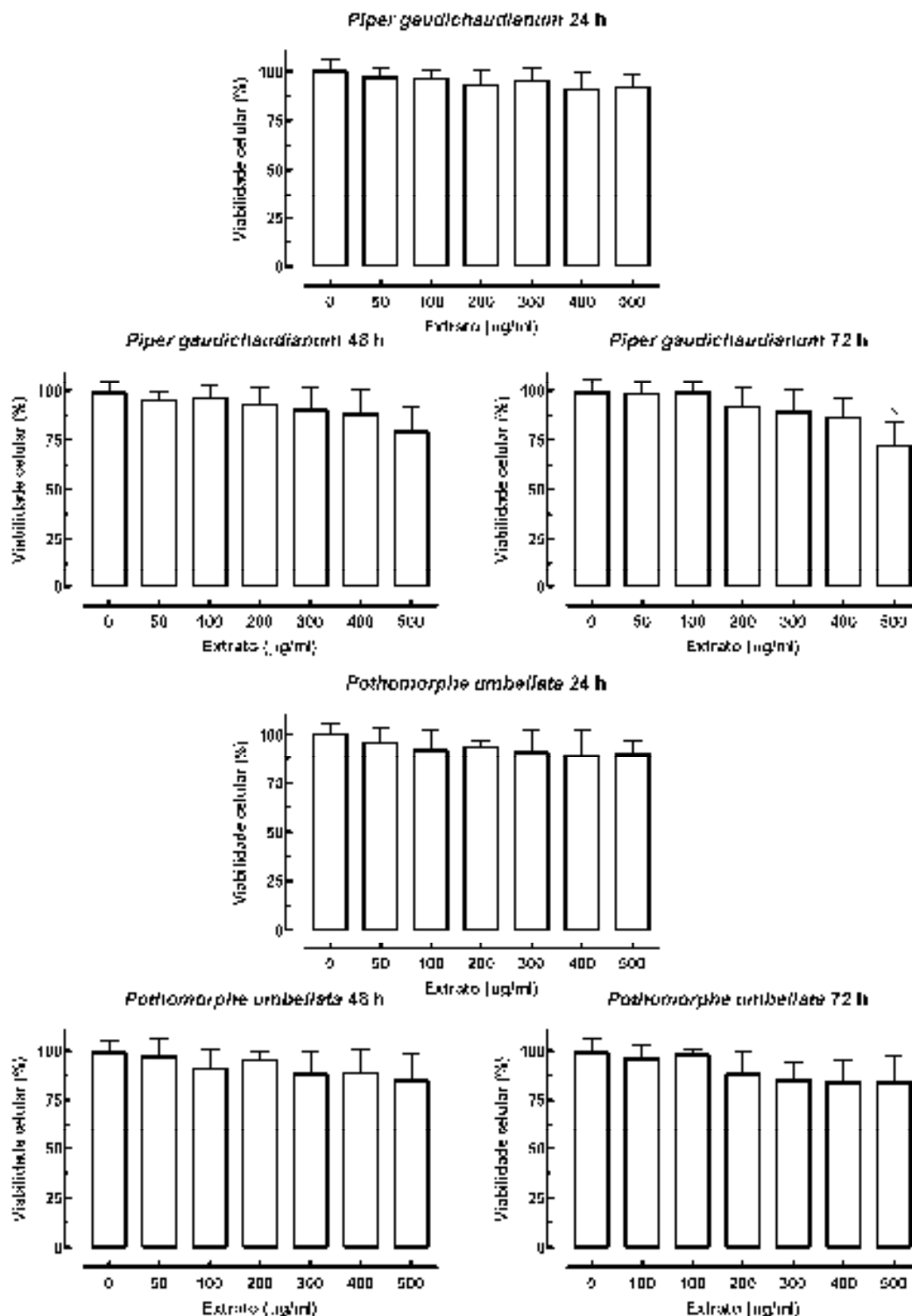


Figura 43. **Viabilidade da célula Vero em presença de extratos de *Piper gaudichaudianum* e *Pothomorphe umbellata*.** As células foram crescidas em meio DMEM, contendo DMSO 0,2%, em presença dos extratos nos tempos e concentrações indicadas. Após diferentes tempos, as células foram fixadas e coradas com cristal violeta em metanol. A viabilidade celular foi avaliada a partir da leitura das absorvâncias (595 nm). Os valores são média de três experimentos independentes feitos em triplicatas. As barras representam o desvio padrão da média. Diferença significativa entre o controle (DMEM contendo DMSO 0,2%) e os grupos tratados com extratos vegetais: *($P < 0,05$).

Considerando somente as concentrações letais aos vermes adultos e esquistossômulos de *S. mansoni* (ver Tabela 6, 42 e 43), somente o praziquantel, na menor concentração 100% letal para esquistossômulos (150 µg/ml), foi citotóxico quando comparado com o grupo controle. Desta forma, todos os compostos e extratos vegetais utilizados neste estudo apresentam atividade em esquistossomos sem afetar a viabilidade das células de mamífero. De fato, a citotoxicidade de alguns compostos e extratos só foi verificada em concentrações de aproximadamente dez vezes maior que a dose capaz de matar 100% dos esquistossomos, como é o caso da amida piplartina e dos extratos de *Piper crassinervium*, *Piper diospyrifolium* e *Piper gaudichaudianum*.

Corroborando os resultados deste trabalho, a ausência da toxicidade em células de mamífero já foi relatada com alguns compostos avaliados neste estudo. O peptídeo antimicrobiano dermaseptina apresenta amplo espectro de atividade (antibacteriana, antifúngica e antiprotozoária) sem afetar a viabilidade de células de mamífero, como hemácias e leucócitos (BRAND et al., 2002). O alcaloide epiisopiloturina apresenta ação antiparasitária em amastigotas de *Leishmania amazonensis* e não é tóxico para as células peritoniais (MIURA et al., 2010; prelo). A amida piplartina possui atividade seletiva contra células tumorais, mas não afeta os leucócitos mononucleares quando avaliada na concentração de 10 µg/ml, tampouco causa hemólise em células de mamíferos na concentração de até 200 µg/ml (BEZERRA, 2005; BEZERRA et al., 2007). A amida piperina também possui atividade seletiva contra células tumorais (PRADEEP e KUTTANE, 2002; SUNILA e KUTTAN, 2004; BEZERRA et al., 2006) e possui diversas atividades biológicas, particularmente antiprotozoária, sem afetar a viabilidade de macrófagos peritoniais (RIBEIRO et al., 2004); além disso, essa amida não causa hemólise (BEZERRA, 2005), e sua toxicidade foi avaliada em camundongos apresentando ausência de toxicidade para fígado e rim, além de não ser capaz de alterar significativamente os parâmetros hematológicos (CARDOSO et al., 2005). Espécies de Piperaceae têm sido utilizadas na alimentação e, também, na medicina tradicional devido ao acúmulo de diferentes classes de metabólitos biologicamente ativos. Muito provavelmente, devido a baixa toxicidade, esses vegetais são usados em muitas regiões do mundo (PARMAR et al., 1997; PRASAD et al., 2005).

5.6 Considerações finais

A esquistossomose continua sendo um dos principais problemas mundiais de saúde pública, especialmente na maioria dos países africanos, asiáticos e alguns países da América Central e América do Sul. Apesar dos esforços em controlar a esquistossomose, esta helmintose continua a ocupar, após a malária, a segunda posição no mundo entre as parasitoses, em termos de extensão de áreas endêmicas e quantidade de pessoas infectadas. Esta doença afeta crianças, jovens, gestantes e grupos populacionais que se locomovem para áreas endêmicas. Tornou-se um fato regular em muitas partes do mundo, sendo associada ao aumento de temperatura do globo, à decadência dos sistemas de saúde, aos movimentos populacionais massivos e à resistência aos quimioterápicos que o parasita apresenta. Para obter-se sucesso no desafio que a questão da esquistossomose representa, há a necessidade de esforços do sistema de saúde, em particular, através da pesquisa e desenvolvimento de novas drogas. Isso facilitaria o controle da parasitose, além de eliminar a mortalidade e diminuir a morbidade (CHITSULO et al., 2000; FENWICH et al., 2003; FENWICH e WEBSTER, 2006; STEINMANN et al., 2006).

Os agentes etiológicos da esquistossomose possuem uma biologia muito interessante, pois passam por diversas fases e vivem em hospedeiros e ambientes diversificados, com uma incrível capacidade de adaptação, multiplicação e resistência. Os parasitas estão muito bem adaptados em seu hospedeiro, podendo viver até mais de 30 anos e, desta forma, desenvolveram mecanismos eficientes de evasão ao sistema imune, resultando, portanto, em uma infecção crônica debilitante que pode persistir por décadas (GRYSEELS et al., 2006).

A vacinação contra a esquistossomose tem sido pesquisada em muitos países, mas ainda não se obteve uma vacina eficiente em função da complexidade do ciclo de vida dos parasitas dentro de seus hospedeiros e, também, pela diversidade de respostas imune que eles geram (DUPRÉ et al., 2001; MCMANUS e LOUCAS, 2008). A maior dificuldade no desenvolvimento de uma vacina contra a esquistossomose tem sido a escolha de antígenos definidos que estimulem uma resposta imune apropriada induzindo a resistência (YANG et al., 2001). Além disso, mesmo com o desenvolvimento de uma vacina no futuro, o tratamento com fármaco não deixaria de ser empregado. Do ponto de vista estratégico e operacional, o tratamento com drogas causaria uma redução na carga parasitária em curto prazo, ao passo que a vacina produziria proteção de longo prazo (BERGQUIST et al., 2002; 2005). No entanto, até o momento, a quimioterapia ainda é a principal forma de controle da esquistossomose (HAGAN et al., 2004; CAFFREY, 2007).

Considerada uma doença negligenciada, a esquistossomose tem recebido pouco investimento em pesquisa sobre novas drogas nas últimas décadas. De fato, com apenas um fármaco disponível para o tratamento, o praziquantel, a quimioterapia da esquistossomose pode estar agora em um ponto crucial (CIOLI; PICA-MATTOCCIA;

ARCHER, 1993, 1995; CIOLI, 1998; FENWICK et al., 2003; BROOKER et al., 2006; FENWICK e WEBSTER, 2006). Contar com apenas um fármaco é, certamente, situação perigosa, especialmente no que diz respeito à resistência. É preocupante que linhagens de *S. mansoni*, em algumas áreas, parecem mostrar certo grau de resistência ao fármaco amplamente empregado (CIOLI; PICA-MATTOCCIA; ARCHER, 1993, 1995; CIOLI, 1998; ISMAIL et al., 1999; DOENHOFF et al., 2002; FENWICK et al., 2006). Dessa forma, há reconhecida necessidade de se desenvolver novos fármacos esquistossomicidas, sendo necessária a identificação de compostos potenciais para se executar um planejamento racional. A Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu a esquistossomose na sua lista de doenças negligenciadas, havendo destaque quanto à necessidade de pesquisa de novos fármacos. Nesse contexto, a OMS vem incentivando a bioprospecção para o encontro de esquistossomicidas (REMME et al., 2002; FENWICK et al., 2003; NOËL, 2008).

O *Schistosoma mansoni* é a espécie usada como modelo para triagem de novas drogas (KEISER, 2010). No presente estudo avaliou-se a toxicidade de 4 compostos isolados de espécies vegetais, as amidas pipartina e piperina, a lignana grandisina e o alcaloide epiisopiloturina; 1 composto isolado da pele de anfíbio, o peptídeo antimicrobiano dermaseptina 01, e de 6 extratos etanólicos obtidos de plantas da família Piperaceae (*Piper tuberculatum*, *P. crassinervium*, *P. diospyrifolium*, *P. fuligineum*, *P. gaudichaudianum* e *Pothomorphe umbellata*) em adultos (machos e fêmeas com 49 dias de idade) e esquistossômulos (recém-transformados, 1, 3, 5 e 7 dias de idade) de *Schistosoma mansoni*. Em particular, o interesse por esses compostos e extratos vegetais baseia-se no fato de serem plantas de fácil propagação, ciclo reprodutivo curto, ampla distribuição geográfica, assim como a facilidade no isolamento de seus metabólitos secundários. Além disso, esses vegetais são comumente usados na medicina popular em muitas regiões do mundo (PALMAR et al., 1997; JARAMILLO e MANOS, 2001; PRASAD et al., 2005; KATO e FURLAN, 2007). Quanto à dermaseptina 01, segundo José Roberto Leite, 2010 (comunicação pessoal; UFPI, Parnaíba, PI) apesar da dificuldade de purificar a dermaseptina da secreção cutânea de anfíbio, esse peptídeo antimicrobiano já é sintetizado há cerca de 8 anos, o que facilita, portanto, sua aquisição.

Os resultados deste estudo, com esquistossômulos e adultos de *S. mansoni*, mostraram que os compostos e extratos reduziram a motilidade e causaram a morte dos parasitas com alterações morfológicas no tegumento, cujos efeitos são diretamente dependentes da concentração, do tempo de incubação e da idade dos helmintos (recém-transformados, 1, 3, 5, 7 e 49 dias de idade). Nas concentrações subletais notou-se, ainda, redução na oviposição. Além disso, nas concentrações letais aos esquistossomos, os compostos e extratos não apresentaram toxicidade em células de mamífero (célula Vero). Pela contagem de tubérculos em uma área conhecida da região dorsal dos

helminhos machos, apresentamos, também, um modelo experimental que avalia quantitativamente o efeito de drogas no tegumento.

Em conjunto, baseado nos ensaios *in vitro* com *S. mansoni*, os resultados com os compostos e extratos apresentaram três aspectos importantes, a saber: a) curativa, pois são tóxicas aos parasitas adultos; b) profilática, pois são tóxicas as formas jovens (esquistossômulos); e c) supressora, pois reduzem ou impedem a oviposição. Apesar de promissores, os resultados foram obtidos de ensaios *in vitro*. É fato que os resultados de testes *in vitro* com muitas drogas não correspondem ao que se observa *in vivo*, mas, por outro lado, o teste *in vitro* é um importante passo para a triagem de potenciais drogas para o controle da esquistossomose (RAMIREZ et al., 2007; KEISER, 2010), como mostrado nos ANEXOS A, B e C.

A avaliação da atividade terapêutica, usando camundongo, principal modelo para os estudos *in vivo* (RAMIREZ et al., 2007; KEISER, 2010), com alguns compostos deverá ser explorado futuramente. O estudo do oograma, associado a quantidade e distribuição dos vermes são os métodos preferidos para avaliação da triagem de drogas *in vivo* (PELLEGRINO et al., 1962; PELLEGRINO e KATZ, 1968). Nessa fase dos ensaios interessa, também, conhecer a menor dose eficaz, os possíveis efeitos colaterais e tóxicos, a melhor via de administração e a ação sobre as diferentes fases evolutivas do verme.

Finalmente, para triagem de drogas, modificações químicas estruturais em compostos promissores, como a piplartina, estão em andamento para que, por intermédio de ensaios, se chegue à definição da melhor relação estrutura/atividade dessa amida. Neste sentido, o nosso grupo está trabalhando em colaboração com o Prof. Dr. Massuo J. Kato (IQ-USP).

6 CONCLUSÃO

1. Todos os compostos e extratos ensaiados causaram alterações na viabilidade das diferentes fases evolutivas do *Schistosoma mansoni* (esquistossômulos recém-transformados, 1, 3, 5 e 7 dias de idade; e adultos, machos e fêmeas com 49 dias de idade). Os compostos e extratos reduziram a motilidade e causaram a morte dos parasitas de forma diretamente dependente da concentração, do tempo de incubação e da fase evolutiva do verme.

2. Considerando os compostos e extratos ensaiados, a amida piplartina, o peptídeo dermaseptina e o extrato das folhas de *Piper tuberculatum* foram os que apresentaram efeito esquistossomicida em menor concentração para os vermes adultos e esquistossômulos. No geral, a atividade helminticida dos produtos naturais em esquistossômulos ocorreu em concentrações menores do que o observado com o praziquantel.

3. A autofluorescência dos esquistossomos permite a análise morfológica do parasita por microscopia confocal sem a presença de um fluoróforo. Desta forma, a contagem de tubérculos em parasitas machos é um modelo experimental que avalia, quantitativamente, o efeito de drogas no tegumento do *Schistosoma mansoni*.

4. Nas concentrações letais, os compostos, exceto grandisina, e extratos causaram alterações morfológicas no tegumento dos esquistossômulos e adultos. A análise quantitativa, feita por microscopia confocal em vermes adultos, revelou que os danos nos tubérculos ocorrem de forma dose-dependente.

5. Os extratos e compostos causaram contração nos esquistossômulos, independentemente da idade, previamente ao efeito antiparasitário.

6. Nas concentrações subletais, exceto grandisina e o extrato de *Piper gaudichaudianum*, os compostos e extratos causaram redução na oviposição dos parasitas, de forma diretamente dependente da concentração. Os compostos dermaseptina e epiisopiloturina, assim como o extrato das folhas de *Piper crassinervium* inibiram, em quase 100%, a postura das fêmeas.

7. Nas concentrações letais para adultos e esquistossômulos, os compostos e extratos não apresentam toxicidade para células de mamífero (células Vero). Em alguns casos, a viabilidade celular foi reduzida somente em concentrações aproximadamente dez vezes superior à dose mínima capaz de matar 100% dos parasitas. Por outro lado, o praziquantel é citotóxico na concentração letal para os esquistossômulos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

ABDULLA, M. H.; LIM, K. C.; SAJID, M.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R. Schistosomiasis mansoni: novel chemotherapy using a cysteine protease inhibitor. **PLoS Med.**, v. 4, p. e14, 2007.

ABDULLA, M. H.; RUELAS, D. S.; WOLFF, B.; SNEDECOR, J.; LIM, K. C.; XU, F.; RENSLO, A. R.; WILLIAMS, J.; MCKERROW, J. H.; CAFFREY, C. R. Drug discovery for schistosomiasis: hit and lead compounds identified in a library of known drugs by medium-throughput phenotypic screening. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, p. e478, 2009.

AHN, Y. J.; LEE, S. B.; LEE, H. S.; KIM, G. H. Insecticidal and acaricidal activity of carvacrol and beta-thujaplicine derived from *Thujopsis dolabrata* var. *hondai* sawdust. **J. Chem. Ecol.**, v. 24, p. 81-90, 1998.

AMARAL, R.; TAUIL, P. L.; LIMA, D. D.; ENGELS, D. An analysis of the impact of the schistosomiasis control programme in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 79-85, 2006. Suppl. 1.

ANDRADE, Z. A.; dos SANTOS, H. A.; BOROJEVIC, R.; GRIMAUD, J. A. Lesões hepáticas produzidas por hycanthone (Etrenol). **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 16, p. 160-170, 1974.

ANDRADE-NETO, M.; SILVEIRA, E. R.; BRAZ-FILHO, R.; GAMBARDELA, M. T. P.; SANTOS, R. H. A. 24-methyl-25-ethyl-dammarane derivatives from *Pilocarpus spicatus*. **Phytochemistry**, v. 35, p. 739-743, 1994.

ARAÚJO, N.; KOHN, A.; OLIVEIRA, Á. A.; KATZ, N. *Schistosoma mansoni*: ação da lovastatina no modelo murino. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 35, p. 35-38, 2002.

AURIAULT, C.; OUAISSI, M. A.; TORPIER, G.; EISEN, H.; CAPRON, A. Proteolytic cleavage of IgG bound to the Fc receptor of *Schistosoma mansoni* schistosomula. **Parasite Immunol.**, v. 3, p. 33-44, 1981.

AURIAULT, C.; PIERCE, R.; CESARI, I. M.; CAPRON, A. Neutral protease activities at different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in mammalian hosts. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 72, p. 377-384, 1982.

BARR, S. G.; WARNER, K. L.; KORNREIC, B. G.; PISCITELLI, J.; WOLFE, A. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage during infection by *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 5160-5161, 2005.

BASCH, P. F. Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. I. Establishment of cultures from cercariae and development until pairing. **J. Parasitol.**, v. 67, p. 179-185, 1981a.

BASCH, P. F. Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. II. Production of infertile eggs by worm pairs cultured from cercariae. **J. Parasitol.**, v. 67, p. 186-190, 1981b.

BASCH P. F.; HUMBERT R. Cultivation of *Schistosoma mansoni* in vitro. III. Implantation of cultured worms into mouse mesenteric veins. **J. Parasitol.**, v. 67, p. 191-195, 1981.

* De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMA TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BATISTA, J. M. Jr.; LOPES, A. A.; AMBRÓSIO, D. L.; REGASINI, L. O.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. DAS.; CICALI, R. M. B.; FURLAN, M. Natural chromenes and chromene derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 31, p. 538-540, 2008.

BERGQUIST, N. R. Schistosomiasis vaccine development: progress and prospects. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 93, p. 95-101, 1998. Suppl. 1.

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

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

BEZERRA, D. P. **Potencial anticâncer da piplartina e piperina, amidas isoladas de plantas do gênero *Piper***, 2005. 140 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

BEZERRA, D. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antiproliferative effects of two amides, piperine and piplartine, from *Piper* species. **Z. Naturforsch. C**, v. 60, p. 539-543, 2005.

BEZERRA, D. P.; CASTRO, F.O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vivo growth-inhibition of Sarcoma 180 by piplartine and piperine, two alkaloid amides from *Piper*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, p. 801-807, 2006.

BEZERRA, D. P.; MILITÃO, G. C.; DE CASTRO, F. O.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; COSTA-LOTUFO, L. V. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. **Toxicol. in Vitro**, v. 21, p.1-8, 2007.

BEZERRA, D. P.; DE CASTRO, F. O.; ALVES, A. P.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A.; ELMIRO, F. J.; DE ALENCAR, N. M.; MESQUITA, R. O.; LIMA, M. W.; COSTA-LOTUFO, L. V. In vitro and in vivo antitumor effect of 5-FU combined with piplartine and piperine. **J. Appl. Toxicol.**, v. 28, p. 156-163, 2008.

BHUNIA, A. K.; WAMPLER, J. L. Animal and cell culture models for foodborne bacterial pathogens. In: FRATAMICO, P. M.; BHUNIA, A. K.; SMITH, J. L. **Foodborne pathogens: microbiology and molecular biology**. Norfolk, UK: Caister Academic Press, 2005. p. 15-32.

BLANCHARD, T. J. Schistosomiasis. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 2, p. 5-11, 2004.

BLANTON, R. E.; LICATE, L. S. Developmental regulation of protein synthesis in schistosomes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 51, p. 201-208, 1992.

BLEICHER, K. H.; BÖHM, H. J.; MÜLLER, K.; ALANINE, A. I. Hit and lead generation: beyond high-throughput screening. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 2, p. 369-378, 2003.

BOISSIER, J.; COSLÉDAN, F.; ROBERT, A.; MEUNIER, B. In vitro activities of trioxaquines against *Schistosoma mansoni*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, p. 4903-4906, 2009.

BODIWALA, H. S.; SINGH, G.; SINGH, R.; DEY, C. S.; SHARMA, S. S.; BHUTANI, K. K.; SINGH, I. P. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **J. Nat. Med.**, v. 61, p. 418-421, 2007.

BOUT, D. T.; DESLÉE, D.; CAPRON, A. Protection against schistosomiasis produced by cyclosporine A. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 33, p. 185-186, 1984.

BOUT, D.; DESLÉE, D.; CAPRON, A. Antischistosomal effect of cyclosporin A: cure and prevention of mouse and rat schistosomiasis mansoni. **Infect. Immun.**, v. 52, p. 823-827, 1986.

BRAGUINE, C. G.; COSTA, E. S.; MAGALHÃES, L. G.; RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A. A.; BASTOS, J. K.; SILVA, M. L.; CUNHA, W. R.; JANUÁRIO, A. H.; PAULETTI, P. M. Schistosomicidal evaluation of *Zanthoxylum naranjillo* and its isolated compounds against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Z. Naturforsch. C**, v. 64, p. 793-797, 2009.

BRAND, G. D.; LEITE, J. R.; SILVA, L. P.; ALBUQUERQUE, S.; PRATES, M. V.; AZEVEDO, R. B.; CARREGARO, V.; SILVA, J. S.; SÁ, V. C.; BRANDÃO, R. A.; BLOCH, C. Jr. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*. Anti-Trypanosoma cruzi activity without cytotoxicity to mammalian cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 49332-49340, 2002.

BRAND, G. D.; LEITE, J. R.; DE SÁ MANDEL, S. M.; MESQUITA, D. A.; SILVA, L. P.; PRATES, M. V.; BARBOSA, E. A.; VINECKY, F.; MARTINS, G. R.; GALASSO, J. H.; KUCKELHAUS, S. A.; SAMPAIO, R. N.; FURTADO, J. R. JR.; ANDRADE, A. C.; BLOCH, C. Jr. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia) **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 347, p. 739-746, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica e controle da mielorradiculopatia esquistossomótica**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde (Série A. Normas e Manuais Técnicos). Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. Gabinete do Ministro: Portaria Nº 104 de 25 de janeiro de 2011. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, n. 18, 26 de jan. 2011. Seção 1. p. 37-38.

BRAZ-FILHO, R.; SOUZA, M. P.; MATOS, M. E. O. Piplartine-dimer A, a new alkaloid from *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 20, p. 345-346, 1981.

BRITO, C. F.; OLIVEIRA, G. C.; OLIVEIRA, S. C.; STREET, M.; RIENGROJPITAK, S.; WILSON, R. A.; SIMPSON, A. J.; CORREA-OLIVEIRA, R. Sm14 gene expression in different stages of the *Schistosoma mansoni* life cycle and immunolocalization of the Sm14 protein within the adult worm. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, p. 377-381, 2002.

BROOKER, S.; CLEMENTS, A. C.; BUNDY, D. A. Global epidemiology, ecology and control of soil-transmitted helminth infections. **Adv. Parasitol.**, v. 62, p. 221-261, 2006.

CABRAL, M. M.; ALENCAR, J. A.; GUIMARÃES, A. E.; KATO, M. J. Larvicidal activity of grandisin against *Aedes aegypti*. **J. Am. Mosq. Control. Assoc.**, v. 25, p. 103-105, 2009.

CAFFREY, C. R. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 11, p. 433-439, 2007.

- CAPRON, A. R. Immunity to schistosomes. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 4, p. 419-424, 1992.
- CAPRON, M. A.; WIEMER, D. F. Piplaroxide, an ant-repellent piperidine epoxide from *Piper tuberculatum*. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 794-795, 1996.
- CARDOSO, J .F .R.; VIANA, E. B.; WARDINI, A. B.; EVANGELISTA, D. W.; LIMA, M. E. F.; SOARES, B. A.; BARRETO JUNIOR, C. B.; BRITO, M. F.; DANELLI, M. G. M.; MAZUR, C. Avaliação do efeito tóxico da piperina isolada da pimenta do reino (*Piper nigrum* L) em camundongos. **Rev. Univ. Rural, Sér. Ci. Vida**, v. 25, p. 85-91, 2005.
- CARNEIRO-SANTOS P.; THORNHILL, J. A.; DOENHOFF, M. J.; HAGAN, P.; KUSEL, J. R. Acidic vesicles of *Schistosoma mansoni*. **Parasitol. Res.**, v. 87, p. 1001-1006, 2001.
- CARVALHO, A. A.; GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V.; KATO, M. J.; VALADARES, M. C.; CUNHA, L. C.; COSTA, E. A. Antinociceptive and antiinflammatory activities of grandisin extracted from *Viola surinamensis*. **Phytother. Res.**, v. 24, p.113-118, 2010.
- CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DE SÃO PAULO. **Divisão de doenças de transmissão hídrica e alimentar**: dados estatísticos. São Paulo: CVE, 2005.
- CHAPPELL, L. H.; THOMSON, A. W.; BARKER, G. C.; SMITH, S. W. G. Dosage, timing, and route of administration of cyclosporin A and nonimmunosuppressive derivatives of dihydrocyclosporin A and cyclosporin C against *Schistosoma mansoni* in vivo and in vitro. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 31, p. 1567-1571, 1987.
- CHINCHAR, V. G.; BRYAN, L.; SILPHADAUNG, U.; NOGA, E.; WADE, D.; ROLLINS-SMITH, L. Inactivation of viruses infecting ectothermic animals by amphibian and piscine antimicrobial. **Virology**, v. 323, p. 268-275, 2004.
- CHIPPAUX, J. P.; LE HESRAN, J. Y.; GARCIA, A.; BRASSEUR, P. Recent studies have reported significant toxicity of artemisinin and its derivatives for schistosomula in various *Schistosoma* species. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 69, p. 1-2, 2003.
- CHIRAC, P.; TORREELE E. Global framework on essential health R&D. **Lancet**, v. 377, p. 1560-1561, 2006.
- CHITSULO, L.; ENGELS, D.; MONTRESOR, A.; SAVIOLI, L. The global status of schistosomiasis and its control. **Acta Trop.**, v. 77, p. 41-51, 2000.
- CÍCERO BEZERRA FELIPE, F.; TRAJANO SOUSA FILHO, J.; DE OLIVEIRA SOUZA, L. E.; ALEXANDRE SILVEIRA, J.; ESDRAS DE ANDRADE UCHOA, D.; ROCHA SILVEIRA, E.; DEUSDÊNIA LOIOLA PESSOA, O.; DE BARROS VIANA, G. S. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. **Phytomedicine**, v. 14, p. 605-612, 2007.
- CIOLI, D. Chemotherapy of schistosomiasis: an update. **Parasitol. Today**, v. 14, p. 418-421, 1998.
- CIOLI, D. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 13, p. 659-663, 2000.

- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L., Praziquantel. **Parasitol. Res.**, v. 90, p. S3-S9, 2003.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Drug resistance in schistosomes. **Parasitol. Today**, v. 9, p. 162-166, 1993.
- CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present...and future? **Pharmac. Ther.**, v. 68, p. 35-85, 1995.
- CLARK, T. E.; APPLETON, C. C.; KVALSVIG, J. D. Schistosomiasis and the use of indigenous plant molluscicides: a rural South African perspective. **Acta Trop.**, v. 66, p. 93-107, 1997.
- COELHO, P. M.; LIMA e SILVA, F. C.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A. Resistance to oxamniquine of a *Schistosoma mansoni* strain isolated from patient submitted to repeated treatments. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.**, v. 39, p. 101-106, 1997.
- COLES, G. C.; MUTAHI, W. T.; KINOTI, G. K.; BRUCE, J. I.; KATZ, N. Tolerance of Kenyan *Schistosoma mansoni* to oxamniquine. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, p. 782-785, 1987.
- CONCEIÇÃO, M. J.; ARGENTO, C. A.; CORRÊA, A. Study of *Schistosoma mansoni* isolates from patients with failure of treatment with oxamniquine. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 375-380, 2000.
- COLLEY, D. G.; WIKEL, S.K. *Schistosoma mansoni*: simplified method for the production of schistosomules. **Exp. Parasitol.**, v. 35, p. 44-51, 1974.
- COTINGUIBA, F.; REGASINI, L. O.; DA SILVA BOLZANI, V.; DEBONSI, H. M.; DUÓ PASSERINI, G.; CICARELLI, R. M. B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Med. Chem. Res.**, v. 18, p. 703-711, 2009.
- CRABTREE, J. E.; WILSON, R. A. *Schistosoma mansoni*: a scanning electron microscope study of the developing schistosomulum. **Parasitology**, v. 81, p. 553-564, 1980.
- CRUZ, A. H.; MENDONÇA, R. Z.; PETRICEVICH, V. L. *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage. **Mediators Inflamm.**, v. 2005, p. 349-359, 2005.
- CURWEN, R. S.; WILSON, R. A. Invasion of skin by schistosome cercariae: some neglected facts. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 63-66, 2003.
- CURWEN, R. S.; ASHTON, P. D.; SUNDARALINGAM, S.; WILSON, R. A. Identification of novel proteases and immunomodulators in the secretions of schistosome cercariae that facilitate host entry. **Mol. Cell Proteomics**, v. 5, p. 835-844, 2006.
- 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. **Parasitol. Res.**, v. 81, p. 543-548, 1995.
- Da SILVA FILHO, A. A.; COSTA, E. S.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. NANAYAKKARA, N. P.; BASTOS, J. K. In vitro antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapota* (Lauraceae). **Phytother. Res.**, v. 22, p. 1307-1310, 2008.

DAGAN, A.; EFRON, L.; GAIDUKOV, L.; MOR, A.; GINSBURG, H. In vitro antiplasmodium effects of dermaseptin S4 derivatives. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, p. 1059-1066, 2002.

DAMONNEVILLE, M.; AURIAULT, C.; PIERCE, R. J.; CAPRON, A. Antigenic properties of *Schistosoma mansoni* aminopeptidases: evolution during the development in mammalian hosts. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 6, p. 265-275, 1982.

DAS, B. P.; CHOWDHURY, D. N.; CHOWDHURY, B.; DAS, G. K.; RAY, T. Studies on some alkaloides for toxicity on larvae of *Culex quinquefasciatus*. **Indian J. Environ. Health**, v. 38, p. 81-85, 1996.

De ARAÚJO, S. C.; de MATTOS, A. C.; TEIXEIRA, H. F.; COELHO, P. M.; NELSON, D. L.; de OLIVEIRA, M. C. Improvement of in vitro efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. **Int. J. Pharm.**, v. 337, p. 307-315, 2007.

De FERREIRA-DA-CRUZ, M.; ADAMI, Y. L.; da ESPINOLA-MENDES, E.; FIGUEIREDO, M. R.; DANIEL-RIBEIRO, C. T. The intraperitoneal *Plasmodium berghei*-Pasteur infection of Swiss mice is not a system that is able to detect the antiplasmodial activity in the *Pothomorphe* plant extracts that are used as antimalarials in Brazilian endemic areas. **Exp. Parasitol.**, v. 94, p. 243-247, 2000.

De MELO, N. I.; MAGALHAES, L. G.; de CARVALHO, C. E.; WAKABAYASHI, K. A.; de P AGUIAR, G.; RAMOS, R. C.; MANTOVANI, A. L.; TURATTI, I. C.; RODRIGUES, V.; GROppo, M.; CUNHA, W. R.; VENEZIANI, R. C.; CROTTI, A. E. Schistosomicidal activity of the essential oil of *Ageratum conyzoides* L. (Asteraceae) against adult *Schistosoma mansoni* worms. **Molecules**, v. 16, p. 762-73, 2011.

De OLIVEIRA PENIDO, M. L.; ZECH COELHO, P. M.; de MELLO, R. T.; PILÓ-VELOSO, D.; de OLIVEIRA, M. C.; KUSEL, J. R.; NELSON, D. L. Antischistosoma activity of aminoalkanethiols, alkylaminoalkanethiosulfuric acids and the corresponding disulfides. **Acta Trop.**, v. 108, 249-255, 2008.

De SOUZA DIAS, L. C.; de JESUS PEDRO, R.; DEBERALDINI E. R. Use of praziquantel in patients with schistosomiasis mansoni previously treated with oxamniquine and/or hycanthon: resistance of *Schistosoma mansoni* to schistosomicidal agents. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, p. 652-659, 1982.

DIAS, L. C.; PEDRO, R. J.; RIGO, E.; GOTO, M. M.; MAFRA, G. L. A human strain of *Schistosoma mansoni* resistant to schistosomicides. **Rev. Saude Publica**, v. 12, p. 110, 1978.

DILLON, G. P.; FELTWELL, T.; SKELTON, J. P.; ASHTON, P. D.; COULSON, P. S.; QUAIL, M. A.; NIKOLAIDOU-KATSARIDOU, N.; WILSON, R. A.; IVENS, A. C. Microarray analysis identifies genes preferentially expressed in the lung schistosomulum of *Schistosoma mansoni*. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, p. 1-8, 2006.

DOENHOFF, M. J.; KIMANI, G.; CIOLI, D. Praziquantel and the control of schistosomiasis. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 364-366, 2000.

DOENHOFF, M.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 21, p. 659-667, 2008.

DOENHOFF, M. J.; KUSEL, J. R.; COLES, G. C.; CIOLI, D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Trans R. Soc. Trop. Méd.**, v. 96, p. 465-469, 2002.

DUBOIS, F.; CABY, S.; OGER, F.; COSSEAU, C.; CAPRON, M.; GRUNAU, C.; DISSOUS, C.; PIERCE, R. J. Histone deacetylase inhibitors induce apoptosis, histone hyperacetylation and up-regulation of gene transcription in *Schistosoma mansoni*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 168, p. 7-15, 2009.

DUPRÉ, HERV M.; SCHACHT, A. M.; CAPRON, A.; RIVEAU, G. Control of schistosomiasis pathology by combination of Sm28GST DNA immunization and praziquantel. **J. Infect. Dis.**, v. 180, p. 454-463, 1999.

DUPRÉ, L.; KREMER, L.; WOLOWCZUK, I.; RIVEAU, G.; CAPRON, A.; LOCHT, C. Immunostimulatory effect of IL-18-encoding plasmid in DNA vaccination against murine *Schistosoma mansoni* infection. **Vaccine**, v. 19, p. 1373-1380, 2001.

EISSA, M. M.; EL-AZZOUNI, M. Z.; AMER, E. I.; BADDOUR, N. M. Miltefosine, a promising novel agent for schistosomiasis mansoni. **Int. J. Parasitol.**, v. 41, p. 235-242, 2011.

EKWALL, B.; SILANO, V.; PAGANUZZI-STAMMATI, A.; ZUCCO, F. Toxicity tests with mammalian cell cultures. In: BOURDEAU, P.; SOMMERS, E.; MARK RICHARDSON, G.; HICKMAN, J. R. **Short-term toxicity tests for non-genotoxic effects**. Chichester, UK: Wiley, 1990, p. 75-97.

EL RIDI, R.; ABOUELDAHAB, M.; TALLIMA, H.; SALAH, M.; MAHANA, N.; FAWZI, S.; MOHAMED, S. H.; FAHMY, O. M. In vitro and in vivo activities of arachidonic acid against *Schistosoma mansoni* and *Schistosoma haematobium*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, p. 3383-3389., 2010.

ERASMUS, D. A. A comparative study of the reproductive system of mature, immature and "unisexual" female *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 67, p. 165-183, 1973.

ERASMUS, D. A. A. Structural and metabolic changes in female *Schistosoma mansoni* following male stimulation. **J. Chem. Ecol.**, v. 12, p. 1755-1764, 1986.

ESTRELA, J. L. V.; GUEDES, R. N. C.; MALTHA, C. R. A.; FAZOLIN, M. Toxicidade de amidas análogas à piperina a larvas de *Ascia monusteorseis* Godart (Lepidoptera: Pieridae) e *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **Neotrop. Entomol.**, v. 32, p. 343-346, 2003.

FAGHIRI, Z.; CAMARGO, S. M.; HUGGEL, K.; FORSTER, I. C.; NDEGWA, D.; VERREY, F.; SKELLY, P. J. 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, 2010.

FALLON, P. G.; DOENHOFF, M. J. Drug-resistance schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 51, p. 83-88, 1994.

FENWICH, A.; SAVIOLI, L.; ENGELS, D.; BERGQUIST, R.; TODD, M. H. Drugs for the control of parasitic diseases: current status and development in schistosomiasis. **Trends Parasitol.**, v. 19, p. 509-515, 2003.

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

FLEURY, Y.; VOUILLE, V.; BEVEN, L.; AMICHE, M.; WRÓBLEWSKI, H.; DELFOUR, A.; NICOLAS P. Synthesis, antimicrobial activity and gene structure of a novel member of the dermaseptin B family. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1396, p. 228-236, 1998.

FONTENELE J. B.; LEAL, L. K.; SILVEIRA, E. R.; FELIX, F. H.; BEZERRA FELIPE, C. F.; VIANA, G. S. Antiplatelet effects of piplartine, an alkalamide isolated from *Piper tuberculatum*: possible involvement of cyclooxygenase blockade and antioxidant activity. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 61, p. 511-515, 2009.

FRANÇA, V. C.; VIEIRA, K. V. M.; LIMA, E. DE O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DA-CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S. Estudo fitoquímico das partes aéreas de *Aristolochia birostris* Ducht. (Aristolochiaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 15, p. 326-330, 2005.

FREIRE-DE-LIMA, L.; RIBEIRO, T. S.; ROCHA, G. M.; BRANDÃO, B. A.; ROMEIRO, A.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; PREVIATO, J. O.; DE LIMA M. E.; DE CARVALHO, T. M.; HEISE, N. The toxic effects of piperine against *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural alterations and reversible blockage of cytokinesis in epimastigote forms. **Parasitol. Res.**, v. 102, p. 1059-1067, 2008.

GAZZINELLI, G.; DE OLIVEIRA, C. C.; FIGUEIREDO, E. A.; PEREIRA, L. H.; COELHO, P. M.; PELLEGRINO, J. *Schistosoma mansoni*: biochemical evidence for morphogenetic change from cercaria to schistosomule. **Exp. Parasitol.**, v. 34, p. 181-188, 1973.

GOBERT, G. N.; CHAI, M.; MCMANUS, D. P. Biology of the schistosome lung-stage schistosomulum. **Parasitology**, v. 134, p. 453-460, 2007.

GOBERT, G. N.; TRAN, M. H.; MOERTEL, L.; MULVENNA, J.; JONES, M. K.; MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Transcriptional changes in *Schistosoma mansoni* during early schistosomula development and in the presence of erythrocytes. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, p. e600, 2010.

GRYSEELS, B.; MBAYE, A.; DE VLAS, S. J.; STELMA, F. F.; GUISSSE, F. VAN LIESHOUT, L.; FAYE, D.; DIOP, M.; LY, A.; TCHUEM-TCHUENTE, L. A.; ENGLER, D.; POLMAN, K. Are poor responses to praziquantel for the treatment of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal due to resistance? An overview of the evidence. **Trop. Med. Int. Health**, v. 6, p. 864-873, 2001.

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

HAGAN, P.; APPLETON, C. C.; COLES, G. C.; KUSEL, J.R.; TCHUEM-TCHUENTÉ, L.A. Schistosomiasis control: keep taking the tablets. **Trends Parasitol.**, v. 20, p. 92-7, 2004.

HARROP, R.; WILSON, R. A. Protein synthesis and release by cultured schistosomula of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 107, p. 265-274, 1993.

HOCKLEY, D. J. Ultrastructure of the tegument of *Schistosoma*. **Adv. Parasitol.**, v. 11, p. 233-305, 1973.

HOCKLEY, D. J.; MCLAREN, D. J. *Schistosoma mansoni*: changes in the outer membrane of the tegument during development from cercaria to adult worm. **Int. J. Parasitol.**, v. 3, p. 13-25, 1973.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICH, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, p. 1018-1026, 2007.

HOTEZ, P. J.; ENGELS, D.; FENWICK, A.; SAVIOLI, L. Africa is desperate for praziquantel. **Lancet**. v. 376, p. 496-498, 2010.

HOWELLS, R. E.; RAMALHO-PINTO, F. J.; GAZZINELLI, G.; DE OLIVEIRA, C. C.; FIGUEIREDO, E. A.; PELLEGRINO, J. *Schistosoma mansoni*: mechanism of cercarial tail loss and its significance to host penetration. **Exp. Parasitol.**, v. 36, p. 373-385, 1974.

HOWELLS, R. E.; GERKEN, S. E.; RAMALHO-PINTO, F. J.; KAWAZOE, U.; GAZZINELLI, G.; PELLEGRINO, J. *Schistosoma mansoni*: tail loss in relation to permeability changes during cercaria-schistosomulum transformation. **Parasitology**, v. 71, p. 9-18, 1975.

HULSTIJN, M.; BARROS, L. A.; NEVES, R. H.; MOURA, E. G.; MACHADO-SILVA, J. R. Morphological changes in the reproductive organs of male and female *Schistosoma mansoni* worms caused by streptozotocin, a drug used to induce diabetes mellitus. **Parasitology**, v. 126, p. 53-61, 2003.

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

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

ISOBE, T.; OHSAKI, A.; NAGATA, K. Antibacterial constituents against *Helicobacter pylori* of Brazilian medicinal plant, Pariparoba. **Yakugaku Zasshi.**, v. 122, p. 291-294, 2002.

JARAMILLO, M. A.; MANOS, P. S. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). **Am. J. Bot.**, v. 88, p. 706-716, 2001.

KATO, M. J.; FURLAN, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. **Pure Appl. Chem.**, v. 79, p. 529-538, 2007.

KATZ, N.; DIAS, E. P.; ARAÚJO, N.; SOUZA, C. P. Estudo de uma cepa humana de *Schistosoma mansoni* resistente a agentes esquistossomicidas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 7, p. 381-387, 1973.

KATZ, N. Chemotherapy of schistosomiasis mansoni. **Adv. Pharmacol. Chemother.**, v. 14, p. 1-70, 1977.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. V. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 33, p. 303-308, 2000.

KATZ, N. Terapêutica experimental da esquistossomose mansoni. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni & esquistossomose**: uma visão interdisciplinar. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 823-847.

KEISER, J. In vitro and in vivo trematode models for chemotherapeutic studies. **Parasitology**, v. 137, p. 589-603, 2010.

KEISER, J.; CHOLLET, J.; XIAO, S. H.; MEI, J. Y.; JIAO, P. Y.; UTZINGER, J.; TANNER, M. Mefloquine-an aminoalcohol with promising antischistosomal properties in mice. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 3, p. e350, 2009.

KUMAR, A.; KHAN, I. A.; KOUL, S.; KOUL, J. L.; TANEJA, S. C.; ALI, I.; ALI, F.; SHARMA, S.; MIRZA, Z. M.; KUMAR, M.; SANGWAN, P. L.; GUPTA, P.; THOTA, N.; QAZI, G.N. Novel structural analogues of piperine as inhibitors of the NorA efflux pump of *Staphylococcus aureus*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 61, p. 1270-1276, 2008.

LAGO, J. H.; RAMOS, C. S.; CASANOVA, D. C.; MORANDIM, A. DE A.; BERGAMO, D. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. DA S.; FURLAN, M.; GUIMARÃES, E. F.; YOUNG, M. C.; KATO, M. J. Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. **J. Nat. Prod.**, v. 67, p. 1783-1788, 2004.

LEITE, J. R.; BRAND, G. D.; SILVA, L. P.; KÜCKELHAUS, S. A.; BENTO, W. R.; ARAÚJO, A. L.; MARTINS, G. R.; LAZZARI, A. M.; BLOCH, C. Jr. Dermaseptins from *Phyllomedusa oreades* and *Phyllomedusa distincta*: Secondary structure, antimicrobial activity, and mammalian cell toxicity. **Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.**, v. 151, p. 336-343, 2008.

LEQUIN, O.; LADRAM, A.; CHABBERT, L.; BRUSTON, F.; CONVERT, O.; VANHOYE, D.; CHASSAING, G.; NICOLAS, P.; AMICHE, M. Dermaseptin S9, an alpha-helical antimicrobial peptide with a hydrophobic core and cationic termini. **Biochemistry**, v. 45, p. 468-480, 2006.

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

LOPES, N. P.; CHICARO, P.; KATO, M. J.; ALBUQUERQUE, S.; YOSHIDA, M. Flavonoids and lignans from *Viola surinamensis* twigs and their in vitro activity against *Trypanosoma cruzi*. **Planta Med.**, v. 64, p. 667-668, 1998.

LORIN, C.; SAIDI, H.; BELAID, A.; ZAIRI, A.; BALEUX, F.; HOCINI, H.; BÉLEC, L.; HANI, K.; TANGY, F. The antimicrobial peptide dermaseptin S4 inhibits HIV-1 infectivity in vitro. **Virology**, v. 334, p. 264-75, 2005.

MACHADO-SILVA, J. R.; NEVES, R. H.; GOMES, D. C. Filogenia, co-evolução, aspectos morfológicos e biológicos das diferentes fases de desenvolvimento do *Schistosoma mansoni*. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão interdisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 43-84.

MAGALHÃES, L. G.; MACHADO, C. B.; MORAIS, E. R.; MOREIRA, E. B.; SOARES, C. S.; DA SILVA, S. H.; DA SILVA FILHO, A. A.; RODRIGUES, V. In vitro schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitol. Res.**, v. 104, p. 1197-1201, 2009.

MAGALHÃES, L. G.; KAPADIA, G. J.; DA SILVA TONUCCI, L. R.; CAIXETA, S. C.; PARREIRA, N. A.; RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A. A. In vitro schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from *Dryopteris* species against *Schistosoma mansoni* adult worms. **Parasitol. Res.**, 106, 395-401, 2010.

- MAIR, G. R.; MAULE, A. G.; SHAW, C.; HALTON, D. W. Muscling in on parasitic flatworms. **Parasitol. Today**, v. 14, p. 73-76, 1998.
- MAIR, G. R.; MAULE, A. G.; DAY, T. A.; HALTON, D. W. A confocal microscopical study of the musculature of adult *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 121, p. 163-170, 2000.
- MANNECK, T.; HAGGENMÜLLER, Y.; KEISER, J. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 137, p. 85-98, 2010.
- MARKS, N. J.; MAULE, A. G. Neuropeptides in helminths: occurrence and distribution. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 692, p. 49-77, 2010.
- MARQUES, J. V.; OLIVEIRA, A.; RAGGI, L.; YOUNG, M. C. M.; KATO, M. J. Antifungal activity of natural and synthetic amides from *Piper* species. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 21, p. 1807-1813, 2010.
- MARTINS, R. C.; LATORRE, L. R.; SARTORELLI, P.; KATO, M. J. Phenylpropanoids and tetrahydrofuran lignans from *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 843-846, 2000.
- MARTINS, R. C.; LAGO, J. H.; ALBUQUERQUE, S.; KATO, M. J. Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. **Phytochemistry**, v. 64, p. 667-670, 2003.
- MCCLANE, B. A. Osmotic stabilizers differentially inhibit permeability alterations induced in Vero cells by *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 777, p. 99-106, 1984.
- MCKERROW, J. H. Parasite proteases. **Exp. Parasitol.**, v. 68, p. 111-115, 1989.
- MCKERROW, J. H.; SALTER, J. Invasion of skin by *Schistosoma cercariae*. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 193-195, 2002.
- MCMANUS, D. P.; LOUKAS, A. Current status of vaccines for schistosomiasis. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 21, p. 225-242, 2008.
- MEHLHORN, H.; BECKER, B.; ANDREWS, P.; THOMAS, H.; FRENKEL, J. K. In vivo and in vitro experiments on the effects of praziquantel *Schistosoma mansoni*. **Drug. Res.**, v. 31, p. 544-554, 1981.
- MILLER, P.; WILSON, R. A. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* from skin to lungs. **Parasitology**, v. 77, p. 281-302, 1978.
- MITSUI, Y.; MIURA, M.; AOKI, Y. In vitro effects of artesunate on the survival of worm pairs and egg production of *Schistosoma mansoni*. **J. Helminthol.**, v. 83, p. 7-11, 2009.
- MIURA, L. M. C. V. **Isolamento do alcalóide epiisopiloturina a partir da biomassa do jaborandi (*Pilocarpus microphyllus*) e avaliação de suas atividades antibacteriana, antileishmania, antiviral, antiesquistosoma e sialagoga**. 2009. 123 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

MIURA L. M.; LIMA, D. F.; MORAES, J.; CARNEIRO, S. M.; BRAND, G. D.; KAWANO, T.; CARVALHO, F. A.; BLOCH C. JR.; BATISTA, M. C. S.; LEITE, J. R. S. A. Evaluation of the in vitro activity of epiisopiloturin alkaloid isolated from jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) against *Schistosoma mansoni* and *Leishmania amazonensis*. **Acta Trop.**, 2010. In Press.

MOHAMED, A. M.; METWALLY, N. M.; MAHMOUD, S. S. *Sativa* seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 205-211, 2005.

MØLGAARD, P.; NIELSEN, S. B.; RASMUSSEN, D. E.; DRUMMOND, R. B.; MAKAZA, N.; ANDREASSEN, J. Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. **J. Ethnopharmacol.**, v. 74, p. 257-264, 2001.

MOR, A.; HANI, K.; NICOLAS, P. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 31635-31641, 1994.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; LOPES, P. O.; NAKANO, E.; YAMAGUCHI, L. F.; KATO, M. J.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of piplartine. **Exp. Parasitol.**, v. 127, p. 357-364, 2011a.

MORAES, J.; NASCIMENTO, C.; MIURA, L. M. C.; LEITE, J. R. S.; NAKANO, E.; KAWANO, T. Evaluation of the in vitro activity of dermaseptin 01, cationic antimicrobial peptide, against *Schistosoma mansoni*. **Chem. Biodivers.**, v. 8, p. 548-558, 2011b.

MORAES, J.; SILVA, M. P.; OHLWEILER, F. P.; KAWANO, T. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 51, p. 77-82, 2009.

MORAND, S.; MÜLLER-GRAF, C. D. Muscles or testes? Comparative evidence for sexual competition among dioecious blood parasites (Schistosomatidae) of vertebrates. **Parasitology**, v. 120, p. 45-56, 2000.

MORANDIM, A. A.; PIN, A. R.; PIETRO, N. A. S.; ALECIO, A. C.; KATO, M. J.; YOUNG, C. M.; DE OLIVEIRA, J. E.; FURLAN, M. Composition and screening of antifungal activity against *Cladosporium sphaerospermum* and *Cladosporium cladosporioides* of essential oils of leaves and fruits of *Piper* species. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 9, p. 6135-6139, 2010.

MORGAN, J. A. T.; DEJONG, R. J.; SNYDER, S. D.; MKOJI, G. M.; LOKER, E. S. *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria*: past history and future trends. **Parasitology**, v. 123, p. S211-S228, 2001.

NAVICKIENE, H. M.; ALÉCIO, A. C.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. D.; YOUNG, M. C.; CAVALHEIRO, A. J.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 621-626, 2000.

NAVICKIENE, H. M.; BOLZANI, V. da S.; KATO, M. J.; PEREIRA, A. M.; BERTONI, B. W.; FRANÇA, S. C.; FURLAN, M. Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. **Phytochem. Anal.**, v. 14, p. 281-284, 2003.

NDAMBA, J.; NYAZEMA, N.; MAKAZA, N.; ANDERSON, C.; KAONDERA, K. C. Traditional herbal remedies used for the treatment of urinary schistosomiasis in Zimbabwe. **J. Ethnopharmacol.**, v. 42, p. 125-132, 1994.

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

NEVES, J. K.; BOTELHO, S. P.; DE MELO, C. M.; PEREIRA, V. R.; DE LIMA, M. DO C.; PITTA IDA R.; ALBUQUERQUE, M. C.; GALDINO, S. L. Biological and immunological activity of new imidazolines against adult worms of *Schistosoma mansoni*. **Parasitol. Res.**, v. 107, p. 531-538, 2010.

NOËL, F. Sistema neuromuscular e controle da motilidade no verme adulto. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão interdisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 207-244.

NOGUEIRA, C. D.; DE MELLO, R. P.; KATO, M. J.; CABRAL, M. M. Disruption of *Chrysomya megacephala* growth caused by lignan grandisin. **J. Med. Entomol.** v. 46, p. 281-283, 2009.

PARAENSE, W. L. The schistosome vectors in Americas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 7-16, 2001. Suppl.

PARREIRA, N. A.; MAGALHÃES, L. G.; MORAIS, D. R.; CAIXETA, S. C.; DE SOUSA, J. P.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L.; NANAYAKKARA, N. P.; RODRIGUES, V.; da SILVA FILHO, A. A. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chem. Biodivers.**, v. p. 993-1001, 2010.

PARMAR, V. S.; JAIN, S. C.; BISHT, K. S.; JAIN, R.; TANEJA, P.; JHA, A.; TYAGI, O. M.; PRASAD, A. K.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; BOLL, P. M. Phytochemistry of the genus *Piper*. **Phytochemistry**, v. 46, p. 597-673, 1997.

PAX, R. A.; BENNETT, J. L. Neurobiology of parasitic platyhelminths: possible solutions to the problems of correlating structure with function. **Parasitology**, v. 102, p. S31-S39, 1991. Suppl.

PAX, R. A.; DAY, T. A.; MILLER, C. L.; BENNETT, J. L. Neuromuscular physiology and pharmacology of parasitic flatworms. **Parasitology**, v. 113, p. S83-S96, 1996. Suppl.

PAYARES, G.; MCLAREN, D. J.; EVANS, W. H.; SMITHERS, S. R. Changes in the surface antigen profile of *Schistosoma mansoni* during maturation from cercaria to adult worm. **Parasitology**, v. 91, p. 83-99, 1985.

PEARCE, E. J.; SHER, A. Mechanisms of immune evasion in schistosomiasis. **Contrib. Microbiol. Immunol.**, v. 8, p. 219-32, 1987.

PELLEGRINO, J.; OLIVEIRA, C. A.; FARIA, J.; CUNHA, A. S. New approach to the screening of drugs in experimental schistosomiasis mansoni in mice. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 11, p. 201-215, 1962.

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

PICA-MATTOCIA, L.; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. **Int. J. Parasitol.**, v. 34, p. 527-533, 2004.

PINHEIRO, C. U. B. Jaborandi (*Pilocarpus* sp., Rutaceae): A wild species and its rapid transformation into a crop. **Econ. Bot.**, v. 51, p. 49-58, 1997.

PRADEEP, C. R.; KUTTAN, G. Effect of piperine on the inhibition of lung metastasis induced B16F-10 melanoma cells in mice. **Clin. Exp. Metastasis**, v. 19, p. 703-708, 2002.

PRASAD, A. K.; KUMAR, V.; ARYA, P.; KUMAR, S.; DABUR, R.; SINGH, N.; CHHILLAR, A. K.; SHARMA, G.; GHOSH, B.; WENGEL, J.; OLSEN, C. E.; PARMAR, V. S. Investigations toward new lead compounds from medicinally important plants. **Pure Appl. Chem.**, v. 77, p. 25-40, 2005.

RAAY, B.; MEDDA, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BASU, M. K. Targeting of piperine intercalated in mannose-coated liposomes in experimental leishmaniasis. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 36, p. 248-251, 1999.

RACE, G. J.; MARTIN, J. H.; MOORE, D. V.; LARSH, J. E. Jr. Scanning and transmission electron microscopy of *Schistosoma mansoni* eggs, cercariae, and adults. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 20, p. 914-924, 1971.

RAMALHO-PINTO, F. J.; GAZZINELLI, G.; HOWELLS, R. E.; MOTA-SANTOS, T. A.; FIGUEIREDO, E. A.; PELLEGRINO, J. *Schistosoma mansoni*: defined system for stepwise transformation of cercaria to schistosomule in vitro. **Exp. Parasitol.**, v. 36, p. 360-372, 1974.

RAMALHO-PINTO, F. J.; GAZZINELLI, G.; HOWELLS, R. E.; PELLEGRINO, J. Factors affecting surface changes in intact cercariae and cercarial bodies of *Schistosoma mansoni*. **Parasitology**, v. 71, p. 19-25, 1975.

RAMIREZ, B.; BICKLE, Q.; YOUSIF, F.; FAKOREDE, F.; MOURIES, M. A.; NWAKA, S. Schistosomes: Challenges in drug screening. **Exp. Opin. Drug Discov.**, v. 2, p. 53-61, 2007.

RAPADO, L. N.; NAKANO, E.; OHLWEILER, F. P.; KATO, M. J.; YAMAGUCHI, L. F.; PEREIRA, C. A.; KAWANO, T. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **J. Helminthol.**, v. 6, p. 1-7, 2010.

REGASINI, L. O.; COTINGUIBA, F.; PASSERINI, G. D.; BOLZANI, V. DA S.; CICARELLI, R.M.B.; KATO, M. J.; FURLAN, M. Trypanocidal activity of *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, p. 199-203, 2009.

REMME, J. H.; BLAS, E.; CHITSULO, L.; DESJEUX, P. M.; ENGERS, H. D.; KANYOK, T. P.; KAYONDO, J. F.; KIOY, D. W.; KUMARASWAMI, V.; LAZDINS, J. K.; NUNN, P. P.; ODUOLA, A.; RIDLEY, R. G.; TOURE, Y. T.; ZICKER, F.; MOREL, C. M. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. **Trends Microbiol.**, v. 10, p. 435-440, 2002.

REY, L. **Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

RIBEIRO, T. S.; FREIRE-DE-LIMA, L.; PREVIATO, J. O.; MENDONÇA-PREVIATO, L.; HEISE, N.; DE LIMA, M. E. Toxic effects of natural piperine and its derivatives on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 14, p. 3555-3558, 2004.

ROGERS, S. H.; BUEDING, E. Hycanthon resistance: development in *Schistosoma mansoni*. **Science**, v. 172, p. 1057-1058, 1971.

ROSS A. G.; BARTLEY, P. B.; SLEIGH, A. C.; OLDS G. R.; LI, Y.; WILLIAMS, G. M.; MCMANUS, D. P. Schistosomiasis. **N. Engl. J. Med.**, v. 346, p. 1212-1220, 2002.

SAAD, J. M.; SOEPADAMO, E.; FANG, X. P.; MCLAUGHLIN, J. L.; FANWICK, P. E. (-)-Grandisin form *Cryptocarya crassinervia*. **J. Nat. Prod.**, v. 54, p. 1681-1683, 1991.

SABAH, A. A.; FLETCHER, C.; WEBBE, G.; DOENHOFF, M. J. *Schistosoma mansoni*: chemotherapy of infections of different ages. **Exp. Parasitol.**, v. 61, p. 294-303, 1986.

SANDERSON, L.; BARTLETT, A.; WHITFIELD, P. J. In vitro and in vivo studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. **J. Helminthol.**, v. 76, p. 241-247, 2002.

SANGSTER, N. C.; SONG, J.; DEMELER, J. Resistance as a tool for discovering and understanding targets in parasite neuromusculature. **Parasitology**, v. 131, p. S179-S190, 2005. Suppl.

SANTOS, A. P.; MORENO, P. R. H. *Pilocarpus* spp.: A survey of its chemical constituents and biological activities. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 40, p. 115-137, 2004.

SAYED, A. A.; SIMEONOV, A.; THOMAS, C. J.; INGLESE, J.; AUSTIN, C. P.; WILLIAMS, D. L. Identification of oxadiazoles as new drug leads for the control of schistosomiasis. **Nat. Med.**, v. 14, p. 407-412, 2008.

SCHELL, S. C. **How to know the trematodes**. Dubuque: WMC Brown, 1970.

SCOTT, I. M.; PUNIANI, E.; DURST, T.; PHELPS, D.; MERALI, S.; ASSABGUI, R. A.; SÁNCHEZ-VINDAS, P.; POVEDA, L.; PHILOGÈNE, B. J. R.; ARNASON, J. T. Insecticidal activity of *Piper tuberculatum* Jacq. extracts: synergistic interaction of piperamides. **Agr. Forest. Entomol.**, v. 4, p. 137-144, 2002.

SCOTT, I. M.; JENSEN, H.; NICOL, R.; LESAGE, L.; BRADBURY, R.; SÁNCHEZ-VINDAS, P.; POVEDA, L.; ARNASON, J. T.; PHILOGÈNE, B. J. R. Efficacy of *Piper* (Piperaceae) extracts for control of common home and garden insect pests. **J. Econ. Entomol.**, v. 97, p. 1390-1403, 2004.

SECOR, W. E. Interactions between schistosomiasis and infection with HIV-1. **Parasite Immunol.**, v. 28, p. 597-603, 2006.

SHARMA, S.; KUMAR, M.; SHARMA, S.; NARGOTRA, A.; KOUL, S.; KHAN, I. A. Piperine as an inhibitor of Rv1258c, a putative multidrug efflux pump of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, p. 1694-701, 2010.

SHUHUA, X.; BINGGUI, S.; CHOLLET, J.; TANNER, M. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harbored in mice treated with praziquantel enantiomers. **Acta Trop.**, v. 76, p. 107-117, 2000a.

SHUHUA, X.; CHOLLET, J.; WEISS, N. A.; BERGQUIST, R. N.; TANNER, M. Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*. **Parasitol. Int.**, v. 49, p. 19-24, 2000b.

SILVA, L. J. Crescimento urbano e doença: A esquistossomose no município de São Paulo (Brasil). **Rev. Saude Públ.**, v. 19, p. 1-7, 1985.

SIMAS, N. K.; LIMA, E. D. A. C.; KUSTER, R. M.; LAGE, C. L.; DE OLIVEIRA FILHO, A. M. Potential use of *Piper nigrum* ethanol extract against pyrethroid-resistant *Aedes aegypti* larvae. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 40, p. 405-407, 2007.

SKELLY, P. J.; ALAN WILSON, R. Making sense of the schistosome surface. **Adv. Parasitol.**, v. 63, p. 185-284, 2006.

SKELLY, P. J.; SHOEMAKER, C. B. Induction cues for tegument formation during the transformation of *Schistosoma mansoni* cercariae. **Int. J. Parasitol.**, v. 30, p. 625-631, 2000.

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, p. 695-700, 1965.

SPARG, S. G.; Van STANDEN, J., JAGER, A. K. Efficiency of traditionally used South African plants against schistosomiasis. **J. Ethnopharmacol.**, v. 73, v. 1-2, p. 209-214, 2000.

STEINAUER, M. L. The sex lives of parasites: investigating the mating system and mechanisms of sexual selection of the human pathogen *Schistosoma mansoni*. **Int. J. Parasitol.**, v. 39, p. 1157-1163, 2009.

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

STIREWALT, M. A. *Schistosoma mansoni*: cercaria to schistosomule. **Adv. Parasitol.**, v. 12, p. 115-182, 1974.

SUNILA, E. S.; KUTTAN, G. Immunomodulatory and antitumor activity of *Piper longum* Linn. and piperine. **J. Ethnopharmacol.**, v. 90, p. 339-346, 2004.

TALLIMA, H.; EL RIDI, R. *Schistosoma mansoni* glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase is a lung-stage schistosomula surface membrane antigen. **Folia Parasitol.**, v. 55, p. 180-186, 2008.

TAMAN, A.; RIBEIRO, P. Investigation of a dopamine receptor in *Schistosoma mansoni*: functional studies and immunolocalization. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 168, p. 24-33, 2009.

TAMAN, A.; RIBEIRO, P. Glutamate-mediated signaling in *Schistosoma mansoni*: a novel glutamate receptor is expressed in neurons and the female reproductive tract. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 176, p. 42-50, 2011.

TCHUEM TCHUENTÉ, L. A.; SOUTHGATE, V. R.; COMBES, C.; JOURDANE, J. Mating behaviour in schistosomes: are paired worms always faithful? **Parasitol. Today**, v. 12, p. 231-236, 1996.

TELES, H. M. S.; CARVALHO, O. S. Implicações da biologia de *Biomphalaria* no controle da esquistossomose. In: CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. **Schistosoma mansoni & esquistossomose: uma visão interdisciplinar**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. p. 459-484.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **Lancet**. v. 359, p. 2188-2194, 2002.

UTZINGER, J.; XIAO, S.; N'GORAN, E. K.; BERGQUIST, R.; TANNER, M. The potential of artemether for the control of schistosomiasis. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 1549-1562, 2001a.

UTZINGER, J.; XIAO, S.; KEISER, J.; CHEN, M.; ZHENG, J.; TANNER, M. Current progress in the development and use of artemether for chemoprophylaxis of major human schistosome parasites. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, p. 1841-1860, 2001b.

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

Van HELLEMOND, J. J.; RETRA, K.; BROUWERS, J. F.; Van BALKOM, B. W.; YAZDANBAKHS, M.; SHOEMAKER, C. B.; TIELENS, A. G. Functions of the tegument of schistosomes: clues from the proteome and lipidome. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, p. 691-699, 2006.

Van NASSAUW, L.; TOOVEY, S.; Van OP DEN BOSCH, J.; TIMMERMANS, J. P.; VERCRUYSE, J. Schistosomicidal activity of the antimalarial drug, mefloquine, in *Schistosoma mansoni*-infected mice. **Travel Med. Infect. Dis.**, v. 6, p. 253-258, 2008.

VASQUES DA SILVA, R.; NAVICKIENE, H. M.; KATO, M. J.; BOLZANI, V. da S.; MÉDA, C. I.; YOUNG, M. C.; FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 521-527, 2002.

VEERAREDDY, P. R.; VOBALABOINA, V.; NAHID, A. Formulation and evaluation of oil-in-water emulsions of piperine in visceral leishmaniasis. **Pharmazie**, v. 59, p. 194-197, 2004.

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

WILSON, R. A.; DRASKAU, T.; MILLER, P.; LAWSON, J. R. *Schistosoma mansoni*: the activity and development of the schistosomulum during migration from the skin to the hepatic portal system. **Parasitology**, v. 77, p. 57-73, 1978.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S. *Schistosoma mansoni*: dynamics of migration through the vascular system of the mouse. **Parasitology**, v. 92, p. 83-100, 1986.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S.; DIXON, B. Migration of the schistosomula of *Schistosoma mansoni* in mice vaccinated with radiation-attenuated cercariae, and normal mice: an attempt to identify the timing and site of parasite death. **Parasitology**, v. 92, p. 101-116, 1986.

WILSON, R. A.; COULSON, P. S.; STURROCK, R. F.; REID, G. D. Schistosome migration in primates: a study in the olive baboon (*Papio anubis*). **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 84, p. 80-83, 1990.

WILSON, R. A. The saga of schistosome migration and attrition. **Parasitology**, v. 136, p. 1581-1592, 2009.

WILSON, M. S.; MENTINK-KANE, M. M.; PESCE, J. T.; RAMALINGAM, T. R.; THOMPSON, R.; WYNN, T. A. Immunopathology of schistosomiasis. **Immunol. Cell Biol.**, v. 85, p. 148-154, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The control of schistosomiasis. **Tech. Rep. Ser.**, v. 728, p. 1-113, 1985.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The control of Schistosomiasis**: second report of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Report of the WHO informal Consultation on Schistosomiasis Control**. Geneva: WHO, 1999.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis**. Technical Report Series 912. Geneva: WHO, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Preventive chemotherapy in human helminthiasis**: coordinated use of anthelmintic drugs in control interventions. Geneva: WHO, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Partners for parasite control**: Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis", Available from: <http://www.who.int/wormcontrol/documents/joint_statements/en/ppc_unicef_finalreport.pdf>. Acesso em 20 jan. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The global atlas on schistosomiasis**. Available from: www.who.int/schistosomiasis/epidemiology. Acesso em 20 jan. 2011.

WYNN, T. A.; THOMPSON, R. W.; CHEEVER, A. W.; MENTINK-KANE, M. M. Immunopathogenesis of schistosomiasis. **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 156-167, 2004.

XAVIER, A. M.; MAGALHÃES, J. A.; CUNHA, G. DOS S.; SILVA, A. C.; TAVARES, D. A.; SARRO-SILVA, M. DE F.; DE MORAES NETO, A. H. Morphological tegument alterations of adult *Schistosoma mansoni*, harbored in non anti-helminthic treated, high-immune-tolerogenic and low-inflammatory mice. **Acta Trop.**, v. 116, p. 95-99, 2010.

XIAO, S. H.; CATTO, B. A. In vitro and in vivo studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 33, p. 1557-1562, 1989.

XIAO, S. H.; CATTO, B. A.; WEBSTER Jr., L.T. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. **J. Infect. Dis.**, v. 151, p. 1130-1137, 1985.

XIAO, S.; BINGGUI, S.; CHOLLET, J.; TANNER, M. Tegumental changes in 21-day-old *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with artemether. **Acta Trop.**, v. 75, p. 341-348, 2000a.

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

XIAO, S.; TANNER, M.; N'GORAN, E. K.; UTZINGER, J.; CHOLLET, J.; BERGQUIST, R.; CHEN, M.; ZHENG, J. Recent investigations of artemether, a novel agent for the prevention of schistosomiasis japonica, mansoni and haematobia. **Acta Trop.**, v. 82, p. 175-181, 2002.

XIAO, S. H.; KEISER, J.; CHOLLET, J.; UTZINGER, J.; DONG, Y.; ENDRISS, Y.; VENNERSTROM, J. L.; TANNER, M. In vitro and in vivo activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, p. 1440-1445, 2007.

XIAO, S. H.; MEI, J. Y.; JIAO, P. Y. The in vitro effect of mefloquine and praziquantel against juvenile and adult *Schistosoma japonicum*. **Parasitol. Res.**, v. 106, p. 237-246, 2009.

YANG, W.; JACKSON, D. C.; ZENG, Q.; MCMANUS, D. P. Multi-epitope schistosome vaccine candidates tested for protective immunogenicity in mice. **Vaccine**, v. 19, p. 103-113, 2000.

YOSRY, A. Schistosomiasis and neoplasia. **Contrib. Microbiol.**, v. 13, p. 81-100, 2006.

ZAMPA, M. F.; ARAÚJO, I. M.; COSTA, V.; NERY COSTA, C. H.; SANTOS, J. R. JR.; ZUCOLOTTI, V.; EIRAS, C.; LEITE, J. R. Leishmanicidal activity and immobilization of dermaseptin 01 antimicrobial peptides in ultrathin films for nanomedicine applications. **Nanomedicine**, v. 5, p. 352-358, 2009.

ZHANG, H. J.; TAMEZ, P. A.; VU, D. H.; GHEE, T. T.; NGUYEN, V. H.; LE, T. X. ; LE, M. H.; NGUYEN, M. C.; DO, T. T.; SOEJARTO, D. D.; FONG, H. H. Antimalarial compounds from *Rhaphidophora decursiva*. **J. Nat. Prod.**, v. 64, p. 772-777, 2001.

ZHANG, Y.; MACARTHUR, C.; MUBILA, L.; BAKER, S. Control of neglected tropical diseases needs a long-term commitment. **BMC Med.**, v. 8, p. 67, 2010.

ANEXOS

ANEXO - A

Schistosoma mansoni: In vitro schistosomicidal
activity of praziquantel



Schistosoma mansoni: In vitro schistosomicidal activity of pipartine

Josué de Moraes^{1,2,*}, Carlos Nascimento¹, Priscilla O.M.V. Lopes¹, Eliana Nakano³, Lydia F. Yamaguchi¹, Massuo J. Kato³, Toshie Kawano³

¹Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

²Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

³Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 21 April 2010

Received in revised form 15 August 2010

Accepted 28 August 2010

Available online 9 September 2010

Keywords:

Schistosoma mansoni

Schistosomiasis

Pipartine

Pharmacology

Schistosomicidal activity

Piper

ABSTRACT

Schistosomiasis is one of the world's poorly neglected tropical diseases, and its control is largely dependent on a single drug, praziquantel. Here, we report the in vitro effect of pipartine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae), on *Schistosoma mansoni* adult worms. A pipartine concentration of 15.8 μ M reduced the motor activity of worms and caused their death within 24 h in a RPMI 1640 medium. Similarly, the highest anti-lethal concentration of pipartine (63.1 μ M) caused a 75% reduction in egg production in spite of coupling. Additionally, pipartine induced morphological changes on the tegument, and a quantitative analysis carried out by confocal microscopy revealed an extensive tegumental destruction and damage in the tubercles. This damage was dose-dependent in the range of 15.8–630.2 μ M. At doses higher than 157.6 μ M, pipartine induced morphological changes in the oral and ventral sucker regions of the worms. It is the first time that the schistosomicidal activity has been reported for pipartine.

Published by Elsevier Inc.

Schistosoma mansoni: In vitro schistosomicidal activity of pipartine

Josué de Moraes^{1,2,*}, Carlos Nascimento¹, Priscilla O.M.V. Lopes¹, Eliana Nakano¹, Lydia F. Yamaguchi³, Massuo J. Kato³, Toshie Kawano¹

¹ Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil.

² Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

³ Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

*Corresponding author: Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil. Fax: +55 11 3726-1505. Tel: +55 11 3726-7222 R. 2281/2158. E-mail: josuem@usp.br.

Abstract

Schistosomiasis is one of the world's greatly neglected tropical diseases, and its control is largely dependent on a single drug, praziquantel. Here, we report the in vitro effect of piplartine, an amide isolated from *Piper tuberculatum* (Piperaceae), on *Schistosoma mansoni* adult worms. A piplartine concentration of 15.8 μM reduced the motor activity of worms and caused their death within 24 h in a RPMI 1640 medium. Similarly, the highest sub-lethal concentration of piplartine (6.3 μM) caused a 75% reduction in egg production in spite of coupling. Additionally, piplartine induced morphological changes on the tegument, and a quantitative analysis carried out by confocal microscopy revealed an extensive tegumental destruction and damage in the tubercles. This damage was dose-dependent in the range of 15.8 to 630.2 μM . At doses higher than 157.6 μM , piplartine induced morphological changes in the oral and ventral sucker regions of the worms. It is the first time that the schistosomicidal activity has been reported for piplartine.

Keywords: *Schistosoma mansoni*, schistosomiasis, piplartine, Piperaceae, schistosomicidal activity, *Piper*.

1. Introduction

Schistosomiasis is one of the most prevalent, debilitating and neglected disease of tropical and subtropical regions, such as Africa, Asia and South America. This parasitic disease ranks second after malaria in terms of its public health importance, and it is estimated that more than 207 million people have been infected worldwide, while 779 million people remain under infection risk (Steinmann et al., 2006). *Schistosoma mansoni* is one of the most common etiological agents of human schistosomiasis, and the disease pathology is, typically,

a consequence of the inflammatory granulomatous reaction due to the deposition of parasite eggs in the liver and other host tissues (Gryseels et al., 2006).

The current treatment is based on the use of praziquantel (PZQ), a non-expensive anthelmintic drug that is highly effective against all schistosome species infecting humans. Since PZQ is generally well-tolerated, its use in mass treatment approaches is quite suitable (Hagan et al., 2004). However, any parasite treatment based on the use of a single drug poses serious concerns regarding the onset of resistance. Therefore, the development of novel and effective schistosomicidal compounds is highly desirable (Caffrey, 2007; Doenhoff et al., 2008). In this context, the search for bioactive natural products against schistosome has great importance for establishing future strategies to control schistosomiasis (Ndamba et al., 1994; Mølgaard et al., 2001; Sanderson et al., 2002; Mohamed et al., 2005).

The genus *Piper* (Piperaceae) includes species that are widely distributed throughout the tropical and subtropical regions of the world (Jaramillo and Manos, 2001). Some of these species are especially important in the traditional medicine of China, India, Southwestern Asia and Latin America. They are used to treat numerous ailments including chronic respiratory diseases, chest pain, hemorrhoids, rheumatism, gastrointestinal disorders, and venereal diseases. Anxiolytic, vasodilator, anesthetic, analgesic, and anti-inflammatory properties of *Piper* species have also been described (for reviews see Parmar et al., 1997; Prasad et al., 2005). Moreover, Piperaceae species have been extensively investigated as a source of new natural products with potential antitumoral, antimicrobial, antifungal, and insecticidal activities. Likewise, chemical studies have revealed the occurrence of several biologically active metabolites such as pyrones, terpenes, lactones, chromenes, chalcones, lignoids, amides, and alkaloids (for reviews see Parmar et al., 1997; Kato and Furlan, 2007).

Piplartine, 5,6-dihydro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propenyl]-2(1H)-pyridinone, is an amide found in several *Piper* species such as *P. tuberculatum* (Navickiene et

al., 2000). This amide has shown several biological activities such as anxiolytic and antidepressant (Cícero Bezerra Felipe et al., 2007) as well antifungal and insecticide (Navickiene et al., 2000, 2003; Vasques da Silva et al., 2002). In addition, piplartine has shown potential activity against protozoan species that cause other neglected tropical diseases. For instance, a piplartine treatment displayed significant in vitro antileishmanial activity against *Leishmania donovani*, and it reduced the parasitic burden and spleen weight in vivo using a hamster model of visceral leishmaniasis (Bodiwala et al., 2007). Similarly, piplartine also showed in vitro trypanocidal activity against epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* (Cotinguiba et al., 2009). Here, we investigated the effect of the piplartine amide isolated from *P. tuberculatum* against the adult worms of *S. mansoni*. The efficacy of this amide was examined regarding: a) schistosome survival; b) reproductive fitness; c) motor activity; and d) alterations on *S. mansoni* tegumental surface examined through confocal microscopy.

2. Material and methods

2.1. Plant material

The plant material was collected in September of 2005 from a specimen of *Piper tuberculatum* growing under greenhouse conditions at the Institute of Chemistry (University of São Paulo-SP, Brazil), and it was identified by Dr. Guillermo E. D. Paredes (Universidad Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Peru). The voucher specimen (Kato-163) was deposited at the Herbarium of the Institute of Biosciences of the University of São Paulo (IB-USP), São Paulo, Brazil.

2.2. Extraction and isolation of piplartine

A dry powder was extracted with MeOH (2 x 2 l) at room temperature over three days from inflorescences of *P. tuberculatum* (500 g). The solutions were filtered and concentrated

under vacuum conditions, yielding dark syrup (47 g). Part of this extract (2 g) was submitted to a silica chromatography column using a gradient of hexane-EtOAc at increasing polarities, which yielded 35 fractions. Fraction 20 (350 mg) was re-crystallized with hot MeOH; a white crystalline compound was obtained (150 mg) and was identified as piplartine (Fig. 1) by ¹H NMR analysis according to published data (Navieckiene et al., 2000).

2.3. Parasite

Schistosoma mansoni (BH strain Belo Horizonte, Brazil) worms have been maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and *Mesocricetus auratus* hamsters hosts at the Parasitology Laboratory (Instituto Butantan, São Paulo, Brazil). Female hamsters, weighting 20 to 22 g, were infected by subcutaneous injection of 150 cercariae. After 7 weeks, adults *S. mansoni* specimens were recovered from the hamster by perfusion with RPMI 1640 medium supplemented with heparin (Smithers and Terry, 1965).

2.4. Ethics statement

This study was approved by the Institutional Review Board of the Instituto Butantan (approval number: 415/07). All animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the Animals Use Ethics Committee of the University of São Paulo (USP, São Paulo, Brazil) and the Instituto Butantan (São Paulo, Brazil); the study was conducted adhering to the institution's guidelines for animal husbandry.

2.5. In vitro studies with *S. mansoni*

Schistosoma mansoni worms harvested from hamsters were washed in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 200 µg/ml of streptomycin, 200 IU/ml of penicillin (Invitrogen), and 25 mM of HEPES. Adult worm pairs (male and female) were incubated in a

24-well culture plate (Techno Plastic Products, TPP) containing 2 ml of the same medium supplemented with 10% heat-inactivated calf serum at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere (Xiao et al., 2007). After 1 to 2 h, pipilartine was added to the culture, yielding a final drug concentration of 3.2 to 630.2 μM (1 to 200 μg/ml) (Xiao and Catto, 1989). Pipilartine was dispensed from a stock solution of 6302.4 μM (2000 μg/ml) in RPMI 1640 containing 2% dimethyl sulfoxide (DMSO). The control worms were assayed in RPMI 1640 medium with 2% DMSO as a negative control group and in 10 μM PZQ as a positive control group. All experiments were carried out in triplicates and were repeated at least three times. Worm motor activity, egg output (oviposition), tegumental alterations, and survival of the parasites were monitored on daily basis for 5 days using an inverted microscope and a stereomicroscope (SMZ 1000, Nikon) (Xiao et al., 2007). LC₅₀ value was calculated from a dose-response inhibition graph.

2.6. Tegumental changes

The quantification of the number of tubercles was performed using a confocal microscope. After the established times or in the occurrence of death, the parasites were fixed in Formalin-acetic-alcohol solution (FAA) and analyzed under a confocal microscope (Laser Scanning Microscopy, LSM 510 META, Zeiss) at 488 nm (exciting) and 505 nm (emission) as described by (Moraes et al., 2009). A minimum of three areas of the tegument of each parasite were assessed. The numbers of tubercles were counted in 20,000 μm² of area calculated with the Zeiss LSM Image Browser software.

2.7. Cytotoxicity assay

The Vero mammalian cells (African green monkey kidney fibroblast) used in this study were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC CCL-81; Manassas, VA)

and provided by Ronaldo Z. Mendonça (Laboratory of Parasitology, Butantan Institute, São Paulo, Brazil). The cytotoxicity was determined by the crystal violet method according to a previously described procedure (Cruz et al., 2005). Briefly, Vero cells maintained in Dulbecco's Minimum Essential Medium (Gibco, BRL) supplemented with 10% heat-inactivated calf serum were seeded at a density of 5×10^6 cells per ml into 96-well culture microplates (Nalge Nunc International). Control cells and/or cells treated with different concentrations of pipartine were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. After 2, 24, 48, 72, and 96 h of incubation, the supernatants were removed and the remaining live cells were assessed by fixing and staining them with crystal violet (0.2% in 20% methanol). The absorbance was measured by reading each well at 595 nm in a microplate reader.

2.8. Statistical analysis

The statistical tests were performed with the GRAPHPAD PRISM (version 4.0) software. Significant differences were determined by one-way analysis of variance (ANOVA) and applying Tukey's test for multiple comparisons with a level of significance set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Effect of pipartine on adult schistosomes survival

The survival of 49-day-old adult worms of *S. mansoni* was assessed in vitro by incubation with different concentrations of pipartine. The effect of pipartine on the mortality rate of both male and female adult worms was analyzed with respect to the concentration and incubation time. All worms died at a concentration of 472.7 µM after 2 h. The lethal effect was also noted at doses of 15.8, 12.6 and 9.5 µM after 24, 48 and 72 h, respectively. In contrast, the worms remained viable in the negative control group until the end of the incubation period (120 h), whereas PZQ 10 µM, the positive control, caused the death of all

the parasites within 2 h (Table 1). The doses of praziquantel required to kill 50% (LC₅₀) of adult worms in vitro were 393.9 and 12.6 µM in 2 and 24 h, respectively. No significant difference was observed in the mortality rate between male and female parasites.

Subsequently, the effect of praziquantel on the motor activity of the worms was examined, and a dose-dependent reduction of activity was observed. For example, a decrease in motor activity was observed in 12 (60%) adult parasites after 2 h of exposure to praziquantel at a concentration of 315.1 µM (Table 1). The body contractions were abolished in all worms treated with praziquantel regardless of the administered dose. Adult parasites exposed to the amide remained elongated throughout the observation time, but no significant differences in worm length could be observed, including in the negative control group. In contrast, all the adult worms incubated in a medium containing 10 µM PZQ became immediately contracted, and their motor activities were significantly reduced (Table 1).

3.2. Effect of praziquantel on the reproductive fitness of *S. mansoni*

Considering the strong lethal effect of praziquantel on adult schistosomes, the in vitro oviposition was continually monitored to assess the sexual fitness of treated worms. Praziquantel at doses higher than 9.5 µM inhibited 100% of egg laying when compared to the control group. However, this effect apparently resulted from the separation of the worms caused by praziquantel, which prevented any reproductive process. At sub-lethal concentrations of praziquantel, *i.e.*, less than 9.5 µM, the parasites remained coupled, but the total number of eggs laid by the surviving worms was significantly reduced ($P < 0.001$). After 120 h, all the worm couples of the control group had produced eggs. Individual counts per worm couple in praziquantel-free medium and in a medium with 6.3 µM of praziquantel were 120 ± 50 and 30 ± 20 (mean \pm SD of ten worm couples), respectively. The cumulative number of eggs laid per

worm couple was established only for those cultures containing live and coupled male and female worms (Fig. 2).

3.3. Morphological alterations on *S. mansoni* induced by praziquantel

In addition to the mortality rate and changes in the motor capacity of *S. mansoni* adults, the results highlighted the effect of praziquantel on the parasite's tegument (Table 1). The morphological alterations of the tegument occurred in a dose-dependent manner and were more pronounced in male than in female adults. No tegumental changes in adult worms were observed in the negative control group, whereas the 10 μM PZQ group had tegumental alteration in all the worms. To further describe the effects on the tegument, we performed the confocal microscopy analysis, which showed alterations caused by praziquantel on the tubercles in a dose-dependent manner at doses higher than 15.8 μM (Figs. 3 and 4). For example, the number of intact tubercles in an area of 20,000 μm^2 on the schistosome's tegument in male worms of the negative control was 49, while in the group exposed to 630.2 μM of praziquantel was 2.

Additional morphological aberrations were observed after 2-24 h of incubation with 315.1 to 630.2 μM of praziquantel; moreover, at this concentration range, all adult male schistosomes showed morphological changes on the oral and ventral sucker regions (Fig. 5). In contrast, female schistosomes showed tegument damage caused by praziquantel but only at doses higher than 157.6 μM . Moreover, no morphological alterations could be observed in the oral and ventral suckers of female worms after incubation with praziquantel at concentrations of 315.1 to 630.2 μM . There was no apparent alteration in the surface of the oral and ventral suckers when the schistosomes were incubated in the negative (DMSO 2%) and positive (PZQ 10 μM) control groups.

3.3. Effect of piplartine on mammalian cells

To examine whether piplartine is tolerated by mammalian cells, we incubated monkey kidney fibroblasts (Vero cells) with piplartine at different concentrations that were lethal to *S. mansoni* adult worms (9.5 to 31.5 μM). The cytotoxicity was not detected in Vero cells after the treatment with piplartine at the maximum dose tested. Based on three independent experiments in triplicate, the cells exposed to piplartine at 9.5, 12.6, 15.8, and 31.5 μM during 2, 24, 48, 72, and 96 h, had no noticeable effects on their viability. Likewise, no cytotoxicity was detected after treatment with PZQ at same concentrations.

4. Discussion

Recently, several in vitro studies have been performed to search for new active compounds against *Schistosoma* species (De Araújo et al., 2007; Mahran et al., 2007; De Oliveira Penido et al., 2008; Boissier et al., 2009; Botros et al., 2009; Magalhães et al., 2009, 2010). In particular, natural products are one of the major sources for prospecting potential antiparasitic compounds. The Brazilian flora is rich in medicinal plants, and Piperaceae is a tropical plant family with a high potential for providing biocidal compounds, including amides and alkaloids (Parmar et al., 1997; Kato and Furlan, 2007). In this study, we evaluated the in vitro effect of piplartine, an amide found in *Piper* species, on *S. mansoni* adult worm mortality and fecundity. To the best of our knowledge, this is the first report to test the in vitro schistosomicidal activity of piplartine.

Several parameters, such as motor activity, tegumental changes and oviposition, are often evaluated as indicators of biological activity and toxicity in studies with schistosomes species (Xiao et al., 1985, 2007; Xiao and Catto, 1989; William et al., 2001; Sanderson et al., 2002; Pica-Mattoccia and Cioli, 2004; De Araújo et al., 2007; De Oliveira Penido et al., 2008; Boissier et al., 2009; Magalhães et al., 2009, 2010). Here, the temporal efficacy of the

piplartine was tested in vitro against *S. mansoni* male and female adult worms. The following parameters were assessed: (1) the effect of pipartine on schistosome survival; (2) the effect of pipartine on reproductive fitness of *S. mansoni*, i.e. egg output per worm pair; (3) the effect of pipartine on motor activity; and (4) the changes on the tegumental surface of *S. mansoni*. All these effects occurred in a dose-dependent manner.

Disparities in drug susceptibility between male and female *S. mansoni* have been previously reported in several in vitro activity trials. Male worms of *S. mansoni* are often more susceptible than female worms in praziquantel resistance studies (Liang et al., 2001; Pica-Mattoccia and Cioli, 2004) and in studies that evaluated the bioactivity of a ginger extract (Sanderson et al. 2002). In contrast, results with compounds other than praziquantel, such as aminoalkanethiosulfuric acids (De Oliveira Penido et al., 2008) and 2-(butylamino)-1-phenyl-1-ethanethiosulfuric acid (De Araújo et al., 2007), showed higher survival rates for male than for female. Remarkably, our in vitro data demonstrated that pipartine exhibited an optimal activity against the adult stage with no differential sensitivity between male and female worms. Indeed, pipartine was effective at low concentrations, and high lethality observed at concentration as low as 9.5 μM .

Concerning the reproductive fitness of *S. mansoni* adults, other plant constituents have shown effects on the worm's egg production. For example, curcumin, extracted from the rhizome of *Curcuma longa* (Magalhães et al., 2009), and some phloroglucinol derivatives, obtained from the rhizomes of *Dryopteris* species (Magalhães et al., 2010), presented in vitro effects on the schistosome's oviposition. A decrease in the schistosome oviposition was also observed using *Nigella sativa* crushed seeds (black seeds) (Mohamed et al., 2005) and a ginger rhizome extract (*Zingiber officinale*) (Sanderson et al., 2002). Our data showed that the incubation of adult *S. mansoni* with pipartine at doses higher than 9.5 μM kept the male and female adult worms separated, which prevented the mating process and further oviposition. In

contrast, at piplartine doses lower than 9.5 μM , the worms remained coupled and produced eggs at a reduced rate (Fig. 2). Thus, piplartine is toxic at higher doses, while at sub-lethal doses, it significantly interferes with the reproductive fitness of *S. mansoni*.

Similarly, our morphological studies revealed severe tegumental changes that occurred rapidly after incubation of *S. mansoni* adult worms with piplartine concentrations higher than 15.8 μM . The microscopy analysis revealed progressive damages on the tegument surface causing its disruption. The changes in the tegument surface included peeling as well as formation and collapsing of tubercles, indicating straight damage to the cells in a direct dose-dependent effect. In addition, morphological changes on oral and ventral sucker regions were observed only at doses higher than 157.6 μM . These tegumental damages were similar to those reported in studies with praziquantel (William et al., 2001). A severe damage to the oral and ventral sucker regions was also reported with praziquantel enantiomers (Shuhua et al., 2000). Thus, the tegumental damage occurs after incubations with doses higher than the lethal concentrations (9.5 μM) suggesting that the worm's death is caused by different mechanisms. Indeed, the tegumental damage may not always result in death (Shuhua et al., 2000).

Furthermore, the tegumental damages were less pronounced or not observed in female worms, which showed severe tegument alterations only with piplartine doses higher than 157.6 μM (data not show). Moreover, female worms showed no damage in the oral and ventral sucker apparatus after incubation with piplartine, even at concentrations of 315.1 to 630.2 μM . Severe damage in the tegument, but not in the sucker apparatus, was also reported in female *S. mansoni* worms treated with artemether (Xiao et al., 1985, 2000a). The male worms in the praziquantel group were more susceptible to the tegumental action than female worms. The tegument is extremely important to the infection success and survival in the host, and it has been a major target for the development of antischistosomal drugs. Therefore, most of the currently used drugs against schistosomes, such as praziquantel (Shuhua et al., 2000;

William et al., 2001), mefloquine (Manneck et al., 2010) and artemether (Xiao et al., 2000b), act by damaging the schistosome tegument.

The mechanism by which praziquantel exerts its effects on the tegument remains unclear. Interestingly, the in vitro effects of praziquantel on *S. mansoni* adults better correlate with the muscular function (motor activity) than with the tegumental destruction. In other words, the induction of lethal tegumental alterations requires higher concentrations of praziquantel than the required to provoke muscular paralysis followed by death. Indeed, concentrations of praziquantel 2-20 times higher were required to produce morphological alterations of *S. mansoni* compared to the doses causing paralysis.

Regarding the cytotoxicity of praziquantel in mammalian cells, the in vitro studies with praziquantel 10 µg/ml (31.5 µM) showed a lack of significant toxicity in human peripheral blood mononuclear cells after 24, 48, and 72 h (Bezerra et al., 2007). In this study, we also examined if praziquantel is tolerated by mammalian cells (Vero cells), and this amide showed no cytotoxicity against Vero cells when exposed to concentrations up to three times higher than the ones with schistosomicidal effects (31.5 µM). Thus, the in vitro schistosomicidal activity of praziquantel was not associated with cytotoxic effects and its mechanism is still unclear.

In conclusion, we demonstrated that praziquantel is an effective compound against *S. mansoni* in vitro. The mortality rate, the effect on the reproductive fitness and the extensive morphological tegument alterations on adult worms showed that praziquantel is a promising schistosomicidal compound. Further studies are required to elucidate the mechanism(s) of praziquantel toxicity against schistosomes and to evaluate its suitability for designing novel antihelminthic agents.

Acknowledgments

We thank Mr. Alexander Seixas de Souza for his excellent technical assistance with confocal microscopy. We are grateful for the financial support received from the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brazil). This paper is dedicated to the memory of Dra. Toshie Kawano, who died on March 30, 2010. Kawano will be remembered by students, faculty, and co-workers alike as an accomplished scientist, dedicated teacher, inspiring mentor, and loyal friend. We, the people of the Laboratory of Parasitology, will honor her by continuing the research that brought so much joy to her life.

References

Bezerra, D.P., Militão, G.C., de Castro, F.O., Pessoa, C., de Moraes, M.O., Silveira, E.R., Lima, M.A., Elmiro, F.J., Costa-Lotufo, L.V., 2007. Piplartine induces inhibition of leukemia cell proliferation triggering both apoptosis and necrosis pathways. *Toxicology in Vitro* 21, 1–8.

Bodiwala, H.S., Singh, G., Singh, R., Dey, C.S., Sharma, S.S., Bhutani, K.K., Singh, I.P., 2007. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. *Journal of Natural Medicines* 61, 418–421.

Boissier, J., Coslédan, F., Robert, A., Meunier, B., 2009. In vitro activities of trioxaquinones against *Schistosoma mansoni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 4903–4906.

Botros, S.S., William, S., Beadle, J.R., Valiaeva, N., Hostetler, K.Y., 2009. Antischistosomal activity of hexadecyloxypropyl cyclic 9-(S)-[3-hydroxy-2-(phosphonomethoxy)propyl]adenine and other alkoxyalkyl esters of acyclic nucleoside phosphonates assessed by schistosome worm killing in vitro. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, 5284–5287.

Caffrey, C.R., 2007. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Current Opinion in Chemical Biology* 11, 433–439.

Cícero Bezerra Felipe F., Trajano Sousa Filho J., de Oliveira Souza, L.E., Alexandre Silveira J., Esdras de Andrade Uchoa, D., Rocha Silveira, E., Deusdênia Loiola Pessoa O., de Barros Viana, G.S., 2007. Piplartine, an amide alkaloid from *Piper tuberculatum*, presents anxiolytic and antidepressant effects in mice. *Phytomedicine* 14, 605–612.

Cotinguiba, F., Regasini, L.O., da Silva Bolzani, V., Deboni, H.M., Duó Passerini, G., Cicarelli, R.M.B., Kato, M.J., Furlan, M., 2009. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. *Medicinal Chemistry Research* 18, 703–711.

Cruz, A.H., Mendonça, R.Z., Petricevich, V.L., 2005. *Crotalus durissus terrificus* venom interferes with morphological, functional, and biochemical changes in murine macrophage. *Mediators of Inflammation* 2005, 349–359.

De Araújo, S.C., de Mattos, A.C., Teixeira, H.F., Coelho, P.M., Nelson, D.L., de Oliveira, M.C., 2007. Improvement of in vitro efficacy of a novel schistosomicidal drug by incorporation into nanoemulsions. *International Journal of Pharmaceutics* 337, 307–315.

De Oliveira Penido, M.L., Zech Coelho, P.M., de Mello, R.T., Piló-Veloso, D., de Oliveira, M.C., Kusel, J.R., Nelson, D.L., 2008. Antischistosome activity of aminoalkanethiols, alkylaminoalkanethiosulfuric acids and the corresponding disulfides. *Acta Tropica* 108, 249–255.

Doenhoff, M., Cioli, D., Utzinger, J., 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases* 21, 659–667.

Gryseels, B., Polman, K., Clerinx, J., Kestens, L., 2006. Human schistosomiasis. *Lancet* 368, 1106–1118.

- Hagan, P., Appleton, C.C., Coles, G.C., Kusel, J.R., Tchuem-Tchuente, L.A., 2004. Schistosomiasis control: keep taking the tablets. *Trends in Parasitology* 20, 92–97.
- Jaramillo, M.A., Manos, P.S., 2001. Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany* 88, 706–716.
- Kato, M.J., Furlan, M., 2007. Chemistry and evolution of the Piperaceae. *Pure and Applied Chemistry* 79, 529–538.
- Liang, Y.S., Coles, G.C., Doenhoff, M.J., Southgate, V.R., 2001. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. *International Journal for Parasitology* 31, 1227–1235.
- Magalhães, L.G., Machado, C.B., Morais, E.R., Moreira, E.B., Soares, C.S., da Silva, S.H., Da Silva Filho, A.A., Rodrigues, V., 2009. In vitro schistosomicidal activity of curcumin against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology Research* 104, 1197-1201.
- Magalhães, L.G., Kapadia, G.J., da Silva Tonuci, L.R., Caixeta, S.C., Parreira, N.A., Rodrigues, V., Da Silva Filho, A.A., 2010. In vitro schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from *Dryopteris* species against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology Research* 106, 395-401.
- Mahran, M.A., William, S., Ramzy, F., Sembel, A.M., 2007. Synthesis and in vitro evaluation of new benzothiazole derivatives as schistosomicidal agents. *Molecules* 12, 622-633.
- Manneck, T., Haggemüller, Y., Keiser, J., 2010. Morphological effects and tegumental alterations induced by mefloquine on schistosomula and adult flukes of *Schistosoma mansoni*. *Parasitology* 137, 85-98.
- Mohamed, A.M., Metwally, N.M., Mahmoud, S.S., 2005. *Sativa* seeds against *Schistosoma mansoni* different stages. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 100, 205-211.

Mølgaard, P., Nielsen, S.B., Rasmussen, D.E., Drummond, R.B., Makaza, N., Andreassen, J., 2001. Anthelmintic screening of Zimbabwean plants traditionally used against schistosomiasis. *Journal of Ethnopharmacology* 74, 257-264.

Moraes, J., Silva, M.P., Ohlweiler, F.P., Kawano, T., 2009. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 51, 77–82.

Ndamba, J., Nyazema, N., Makaza, N., Anderson, C., Kaondera, K.C., 1994. Traditional herbal remedies used for the treatment of urinary schistosomiasis in Zimbabwe. *Journal of Ethnopharmacology* 42, 125-132.

Navickiene, H.M., Alécio, A.C., Kato, M.J., Bolzani, V.D., Young, M.C., Cavalheiro, A.J., Furlan, M., 2000. Antifungal amides from *Piper hispidum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* 55, 621-626.

Navickiene, H.M., Bolzani, V. da S, Kato, M.J., Pereira, A.M., Bertoni, B.W., França, S.C., Furlan, M., 2003. Quantitative determination of anti-fungal and insecticide amides in adult plants, plantlets and callus from *Piper tuberculatum* by reverse-phase high-performance liquid chromatography. *Phytochemical Analysis* 14, 281-284.

Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.M., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E. and Boll, P.M., 1997. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry* 46, 597–673.

Pica-Mattoccia, L., Cioli, D., 2004. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *International Journal for Parasitology* 34, 527–533.

Prasad, A.K., Kumar, V., Arya, P., Kumar, S., Dabur, R., Singh, N., Chhillar, A.K., Sharma, G., Ghosh, B., Wengel, J., Olsen, C.E. and Parmar, V.S., 2005. Investigations toward

new lead compounds from medicinally important plants. *Pure and Applied Chemistry* 77, 25–40.

Sanderson, L., Bartlett, A., Whitfield, P.J., 2002. In vitro and in vivo studies on the bioactivity of a ginger (*Zingiber officinale*) extract towards adult schistosomes and their egg production. *Journal of Helminthology* 76, 241–247.

Shuhua, X., Binggui, S., Chollet, J., Tanner, M., 2000. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with praziquantel enantiomers. *Acta Tropica* 76, 107–117.

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

Smithers, S.R., Terry, R.J., 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* 55, 695–700.

Vasques da Silva, R., Navickiene, H.M., Kato, M.J., Bolzani, V.da S., Méda, C.I., Young, M.C., Furlan, M., 2002. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Phytochemistry* 59, 521–527.

William, S., Botros, S., Ismail, M., Farghally, A., Day, T.A., Bennett, J.L., 2001. Praziquantel-induced tegumental damage in vitro is diminished in schistosomes derived from praziquantel-resistant infections. *Parasitology* 122, 63–66.

Xiao, S.H., Catto, B.A., Webster, L.T.Jr., 1985. Effects of praziquantel on different developmental stages of *Schistosoma mansoni* in vitro and in vivo. *The Journal of Infectious Diseases* 151, 1130–1137.

Xiao, S.H., Catto, B.A., 1989. In vitro and in vivo studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 33, 1557–1562.

Xiao, S., Binggui, S., Chollet, J., Tanner, M., 2000a. Tegumental changes in 21-day-old *Schistosoma mansoni* harboured in mice treated with artemether. *Acta Tropica* 75, 341–348.

Xiao, S., Shen, B., Chollet, J., Utzinger, J., Tanner, M., 2000b. Tegumental changes in adult *Schistosoma mansoni* harbored in mice treated with artemether. *The Journal of Parasitology* 86, 1125–1132.

Xiao, S.H., Keiser, J., Chollet, J., Utzinger, J., Dong, Y., Endriss, Y., Vennerstrom, J.L., Tanner, M., 2007. In vitro and in vivo activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, 1440–1445.

Legends to Figures

Fig. 1. Chemical structure of pipartine [5,6-dihydro-1-[1-oxo-3-(3,4,5-trimethoxyphenyl)-2-propenyl]-2(1H)-pyridinone].

Fig. 2. *In vitro* effect of pipartine on *Schistosoma mansoni* oviposition. Adult worm couples were incubated with pipartine, and at the indicated time periods, the cumulative number of eggs per worm couple was assessed and scored using an inverted microscope. Values are means \pm SD (bars) of ten worm couples. *P < 0.05, **P < 0.01, and ***P < 0.001 compared with untreated groups.

Fig. 3. Effect of pipartine on the tegument of *Schistosoma mansoni*. After 24 hours of incubation with pipartine, adult male worms were fixed in FAA solution and fluorescent images were obtained using confocal microscopy (Carl Zeiss LSM 510 META). The images were analyzed with the Zeiss LSM Image Browser software. (A) Negative control. (B) pipartine 6.3 μ M. (C) pipartine 15.8 μ M. (D) pipartine 31.5 μ M. (E) pipartine 78.8 μ M. (F) pipartine 157.6 μ M. (G) pipartine 315.1 μ M. (H) pipartine 393.9 μ M. (I) pipartine 472.7 μ M. (J) pipartine 630.2 μ M. Bars = 50 μ m.

Fig. 4. Effect of the pipartine amide on tubercles of *Schistosoma mansoni* male worms. The quantification of the number of tubercles was performed using confocal microscopy.

Indicated are numbers of intact tubercles and these numbers were measured in a 20,000 μ m² of area calculated with the Zeiss LSM Image Browser software. Praziquantel (PZQ, 10 μ M) was used as positive control. A minimum of three tegument areas of each parasite were

assessed. Values are means \pm SD (bars) of ten male adult worms. **P < 0.01 and ***P < 0.001 compared with untreated groups.

Fig. 5. Morphological changes on the oral and ventral sucker region of *Schistosoma mansoni* after incubation with pipartine. After 24 hours of incubation with pipartine, adult male worms were fixed in FAA solution and fluorescent images were obtained using confocal microscopy (Carl Zeiss LSM 510 META). The images were analyzed with the Zeiss LSM Image Browser software. (A) Control. (B) pipartine 157.6 μ M. (C) pipartine 315.1 μ M. (D) pipartine 472.7 μ M. (E) pipartine 630.2 μ M. Bars = 100 μ m.

Fig. 1

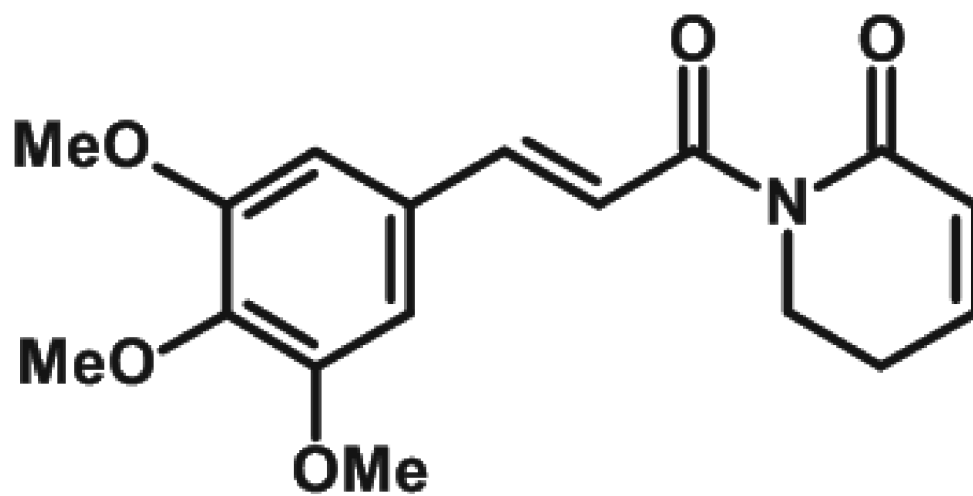


Fig. 2

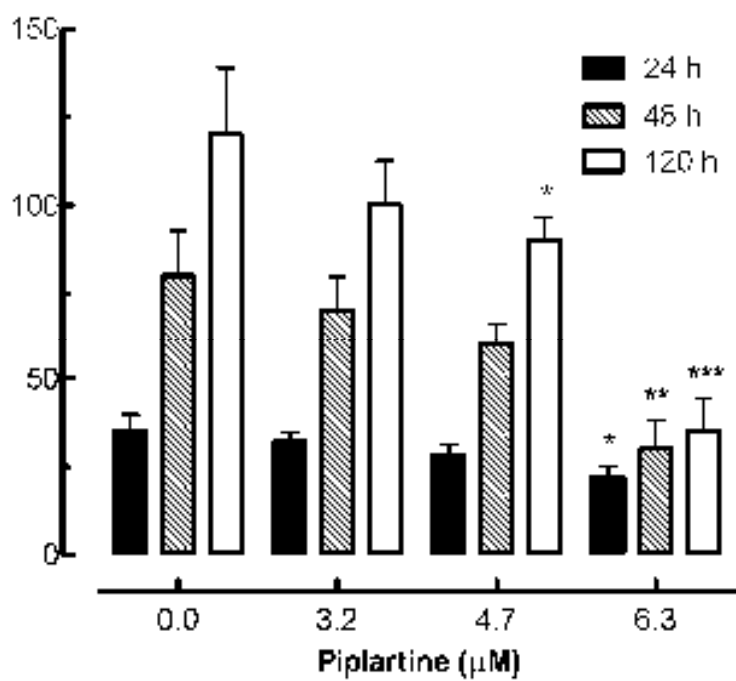


Fig. 3

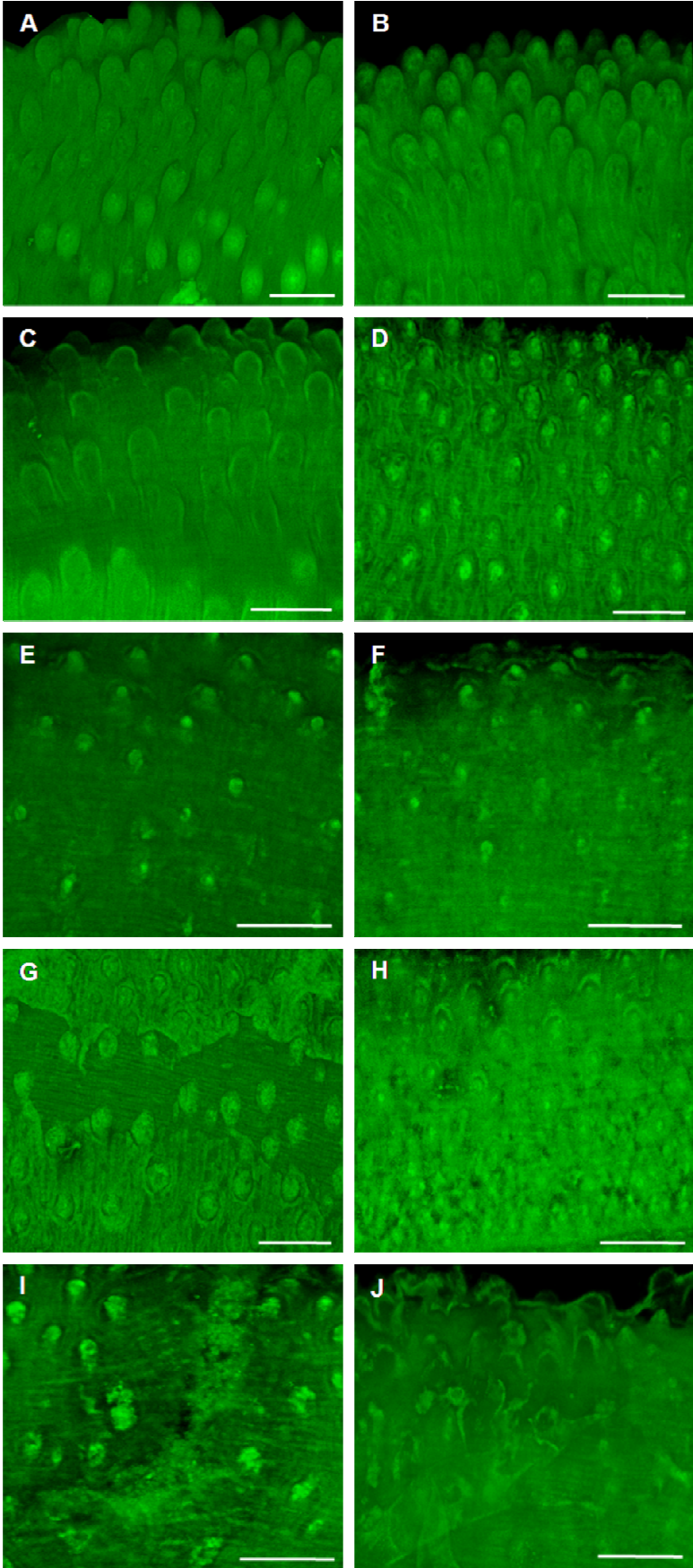


Fig. 4

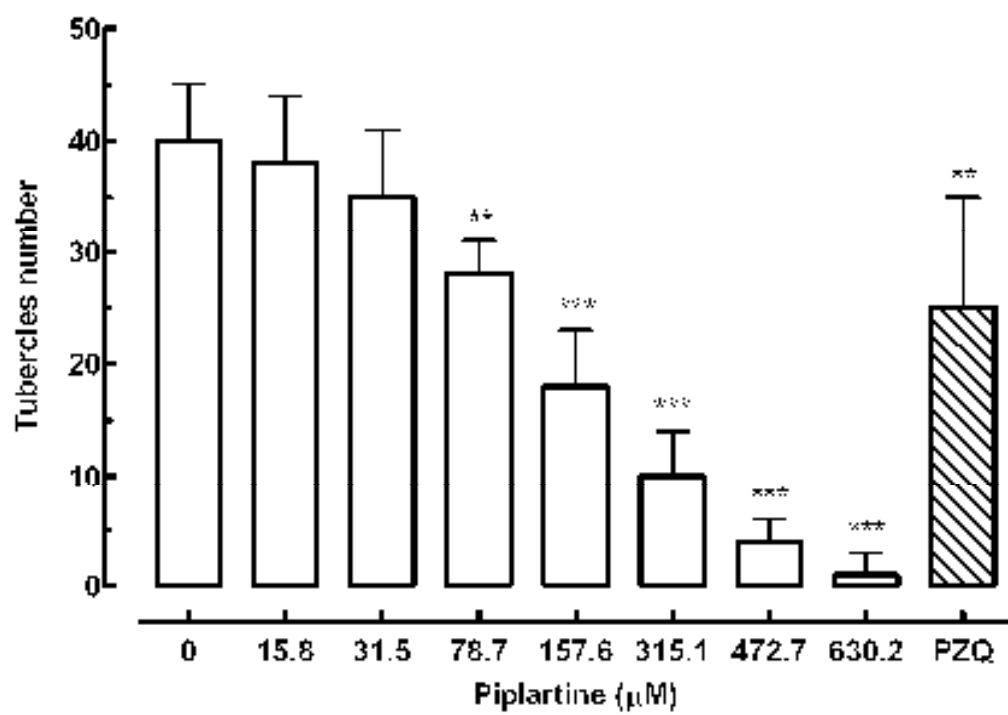
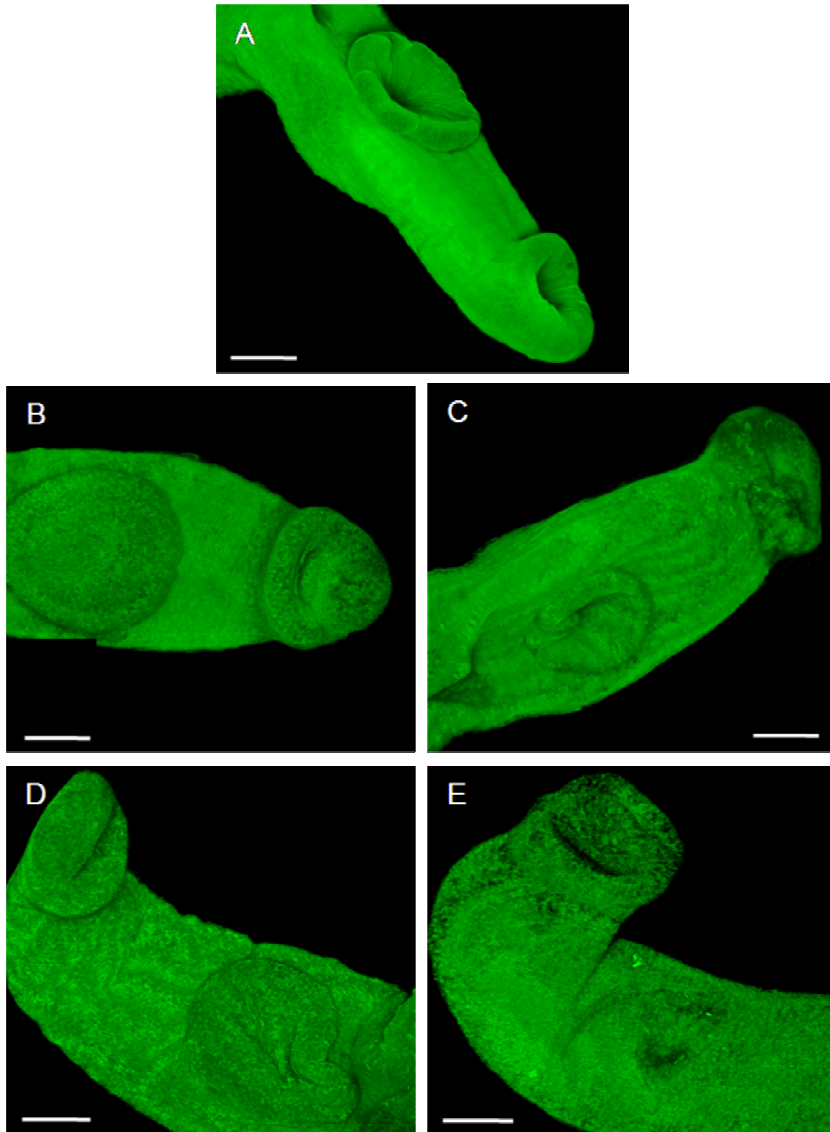


Fig. 5



ANEXO - B

Evaluation of the in vitro activity of dermaseptin
01, cationic antimicrobial peptide, against
Schistosoma mansoni

Evaluation of the *in vitro* Activity of Dermaseptin 01, a Cationic Antimicrobial Peptide, against *Schistosoma mansoni*

by Josué de Moraes^{a,b}), Carlos Nascimento^a), Leiz M. C. V. Miura^c), José R. S. A. Leite^c), Eliana Nakano^a), and Toshie Kawano^a)

^a) Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil 1500, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil (phone: +55-11-37267222 ext. 2281/2158; fax: +55-11-37261505; e-mail: josuem@usp.br, josuemoraes@ig.com.br)

^b) Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

^c) Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, Campus Ministro Reis Velloso, Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brazil

Dedicated to the memory of Dra. Toshie Kawano, who died on March 30, 2010. Dra. Kawano will be remembered by students, faculty members, and co-workers as an accomplished scientist, dedicated teacher, inspiring mentor, and loyal friend. The collaborators of the Laboratory of Parasitology will honor her by continuing the research that brought so much joy to her life.

Schistosomiasis is a neglected tropical disease that remains a considerable public health problem worldwide. Since the mainstay of schistosomiasis control is chemotherapy with a single drug, praziquantel, drug resistance is a concern. Here, we examined the *in vitro* effects of dermaseptin 01 (DS 01), an antimicrobial peptide found in the skin secretion of frogs of the genus *Phyllomedusa*, on *Schistosoma mansoni* adult worms. DS 01 at a concentration of 100 µg/ml reduced the worm motor activity and caused the death of all worms within 48 h in *RPMI 1640* medium. At the highest sublethal concentration of antimicrobial peptide (75 µg/ml), a 100% reduction in egg output of paired female worms was observed. Additionally, DS 01 induced morphological alterations on the tegument of *S. mansoni*, and a quantitative analysis carried out by confocal microscopy revealed extensive destruction of the tubercles in a dose-dependent manner over the concentration range of 50–200 µg/ml. It was the first time that an anthelmintic activity towards schistosomes has been reported for a dermaseptin.

**Evaluation of the *in vitro* Activity of Dermaseptin 01, Cationic Antimicrobial Peptide,
Against *Schistosoma mansoni***

by **Josué de Moraes*^{a)}^{b)}**, **Carlos Nascimento ^{a)}**, **Leiz M.C.V. Miura ^{c)}**,
José R.S.A. Leite ^{c)}, **Eliana Nakano ^{a)}**, and **Toshie Kawano ^{a)}**

^{a)} Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, Avenida Vital Brasil 1500, 05503-900,
São Paulo, SP, Brazil.

(Phone: +55 11 3726-7222 R. 2281/2158; fax: +55 11 3726-1505; e-mail addresses:

josuem@usp.br, josuemoraes@ig.com.br).

^{b)} Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

^{c)} Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, *Campus* Ministro Reis Velloso,
Universidade Federal do Piauí, Parnaíba, PI, Brazil.

Schistosomiasis is a neglected tropical disease that remains of considerable public health significance in worldwide. Since the mainstay of schistosomiasis control is chemotherapy with a single drug, praziquantel, drug resistance is a concern. Here, we examined the *in vitro* effects of dermaseptin 01, an antimicrobial peptide found in the skin secretion from frogs of the genus *Phyllomedusa*, on *Schistosoma mansoni* adult worms. Dermaseptin 01 at 100 µg/ml reduced worm motor activity and caused death of all worms within 48 h in a RPMI 1640 medium. At the highest sub-lethal concentration of antimicrobial peptide (75 µg/ml), a 100% reduction in egg output of paired female worms was observed. Additionally, dermaseptin 01 induced morphological alterations in the tegument of *S. mansoni*, and a quantitative analysis carried out by confocal microscopy revealed extensive destruction of the tubercles in a dose-dependent manner in the range of 50-200 µg/ml. It is the first time that the antiparasitic activity towards schistosomes has been reported for a dermaseptin.

Introduction. – Schistosomiasis remains one of the most prevalent and debilitating disease in tropical and subtropical regions. This parasitic disease is the most important human helminth infection in terms of morbidity and mortality, and it is surpassed only by malaria on public health importance. More than 207 million people have been infected worldwide, while 779 million people remain under infection risk [1] [2]. *Schistosoma mansoni* is one of the most common etiological agents for human schistosomiasis and the disease pathology is typically a consequence of the inflammatory granulomatous reaction due to parasite egg deposition in the liver and other host tissues [3].

The treatment and control of schistosomiasis are based on a single drug, praziquantel (PZQ). It has minimal side effects, but the control of schistosomiasis with PZQ at population level faces problems, including the development of drug resistance [4] [5]. Given the potential for parasite resistance, development of new and effective schistosomicidal compounds is highly desirable [6-8].

Antimicrobial peptides are short cationic peptides made up of less than 50 amino acids. They are cationic and amphipathic peptide of variable length, structure, amino acid sequence, and spectrum of action [9] [10]. In addition, these peptides play an important role in host defense against pathogens, and they exert antimicrobial action through their effect on the membrane of target cells by a mechanism, whose details remains to be understood [9] [11-13].

More than 80 antimicrobial peptides have been isolated from only twelve species of the Phyllomedusinae subfamily, belonging to the genera *Agalychnis*, *Hylomantis*, *Pachymedusa*, and *Phyllomedusa* [14]. In 1987, magainins from frog skin were discovered and these antimicrobial peptides have been shown to exhibit potent activity against numerous species of bacteria and fungi [15]. Subsequently, a number of other skin-derived antimicrobial peptides

were discovered in different frog species, and among the most studied are the ones from the dermaseptin family [16-18].

Dermaseptins (DSs) are cationic antimicrobial peptides of 24–34 residues found in skin secretion of representatives of the frog genus *Phyllomedusa* [16] [19-21]. These peptides have been shown to exert activity against a wide range of microorganisms, including gram-negative and gram-positive bacteria [16] [19], filamentous fungi and yeast [22-24] as well as antiviral effects [25-27].

Additionally, it was shown that DSs have potent activity against causative agents of several neglected tropical diseases. These peptides exhibited significant *in vitro* activity against trypomastigote and epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* [16] and promastigote forms of *Leishmania amazonensis* [20] and *L. chagasi* [28]. Dermaseptins also showed *in vitro* antiplasmodium effects [29].

Besides the fact that DSs are active against a large spectrum of microorganisms, they have been considered promising candidates for new anti-infective drugs. As an advantage, it has been demonstrated that this compound do not induce significant cytolysis against mammalian blood cells [16] [30].

Dermaseptin 01 (DS 01) was previously shown to kill bacteria, fungi, and protozoa with irrelevant toxicity activity against mammalian cells [16] [24] [28]. This is a 29-residue-long peptide that was found in skin secretion of *Phyllomedusa oreades*, which is a newly described and endemic amphibian species of the Brazilian Savanna [16]. Although DSs have a broad range of activities, antihelminthic effects have not yet been reported. In the present study, we reported for the first time the *in vitro* activity of a DS, specifically DS 01, against *S. mansoni*. The efficacy of this peptide was examined regarding: a) schistosomes survival; b) reproductive fitness; c) motor activity; and d) alterations on *S. mansoni* tegumental surface examined through confocal microscopy.

Results and Discussion. – 1. *Effect of dermaseptin 01 on adult schistosomes survival.*

Schistosoma mansoni is the most widely used schistosome model for chemotherapeutic studies [31]. Dermaseptin 01 is a cationic antimicrobial peptide that was isolated from *Phyllomedusa oreades* (Fig. 1). In this study, the survival of 49-day-old adult worm pairs of *S. mansoni* was assessed *in vitro* with incubation with different concentrations of DS 01. The effect of peptide on mortality rates of both male and female adult worms was analyzed regarding concentrations and incubation time. Bioassays revealed that DS 01 is potent anti-*S. mansoni* agents at concentrations up to 50 µg/ml. All worms had died 24 h after incubation with 200 µg/ml of peptide. The lethal effect was also noted at doses of 100 and 50 µg/ml after 48 and 120 h, respectively (Fig. 2 and Table 1); whereas no deaths were observed in the control group.

Considering mortality rate, no significant difference was observed between male and female parasites (Fig. 2). On the other hand, disparities on drug susceptibility between males and females have been previously reported on some *in vitro* activity trials. Male worms of *S. mansoni* are often more susceptible than female worms on praziquantel resistance studies [5] [32] and studies on the bioactivity of a ginger extract [33]. However, results with compounds other such as aminoalkanethiosulfuric acids [34], 2-(butylamino)-1-phenyl-1-ethanethiosulfuric acid [35], and artenusate [36] showed higher survival rates for males than females. Notwithstanding, our *in vitro* data demonstrated that DS 01 exhibited activity against adult stages and no significant differences in mortality rate between male and female worms were observed.

Besides, the effect of DS 01 on motor activity of worms was examined and a dose-dependent motor activity decrease could be observed. For example, a decrease in motor activity was observed in 12 (60%) adult parasites 120 h after exposure to 25 µg/ml of

dermaseptin, and all worms showed reduction in motor activity after 24 h at a peptide concentration of 100 µg/ml. The resulting data are summarized in Table 1.

2. *Effect of dermaseptin 01 on reproductive fitness of S. mansoni.* Considering the lethal effect of DS 01 on adult schistosomes, *in vitro* oviposition at sub-lethal concentration was continually monitored in order to assess sexual fitness of exposed worms. The cumulative numbers of eggs laid by each worm couple were established only for those cultures containing live and coupled male and female worms. Fig. 3 shows that when live worm pairs were incubated for 24 to 72 h with concentration ranging between 25 and 75 µg/ml, the peptide was able to inhibit egg laying when compared to the control group. For example, after 72 h of incubation, worm pairs of *S. mansoni* exposed to 25, 50 and 75 µg/ml of dermaseptin showed inhibited oviposition in about 61%, 91%, and 100%, respectively, when compared to the control.

Concerning reproductive fitness of *S. mansoni* adults, some compounds have shown effects on the egg production of worms. For example, curcumin, extracted from the rhizome of *Curcuma longa* [37], some phloroglucinol derivatives obtained from the rhizomes of *Dryopteris* species [38], and artenusate [36] presented *in vitro* inhibitory effects on schistosome oviposition. The decrease on egg-laying in schistosomes was also observed with the use of *Nigella sativa* crushed seeds (black seeds) [39] and an extract of ginger rhizomes (*Zingiber officinale*) [33]. Our data corroborates these *in vitro* studies and showed that DS 01 is toxic at higher doses, while at sub-lethal doses, it significantly interferes with the reproductive fitness of *S. mansoni*.

3. *Tegumental surface alterations on S. mansoni induced by dermaseptin 01.* In addition to mortality rate and changes in motor capacity of *S. mansoni* adults, the results highlighted the inducing effect of DS 01 on parasite's tegument morphological alterations (Table 1). Such events took place in a dose-dependent manner and were more pronounced on adult males.

Confocal microscopy analysis showed significant damage in tubercles of all adult male worms after exposure to a medium containing peptide at concentrations of 50 to 200 $\mu\text{g/ml}$, whereas no tegumental surface alterations were observed in the control group (Fig. 4). A pattern consisting of a combination of changes in surface morphology were detected and correlated to the death of the worms (Fig. 4 and Table 1).

Additionally, for the extraction of quantitative parameters, an area of 20,000 μm^2 was demarcated and tubercles were counted and evaluated as intact or altered. Morphological characterization by laser scanning microscopy revealed alterations caused by DS 01 on the tubercles in a dose-dependent manner at doses higher than 50 $\mu\text{g/ml}$. For example, a decrease from 41 to 3 tubercles was observed on male schistosome tegument in control and 200 $\mu\text{g/ml}$ of peptide assays, respectively. Dose-response relationships and tegumental surface alteration in *S. mansoni* following treatment with DS 01 *in vitro* are summarized in Fig. 5.

The tegument is extremely important to infection success and survival in the host and has been a major target for antischistosomal drugs. Therefore, most of the current used drugs against schistosomes such as praziquantel [40] [41], mefloquine [42] and artemether [43], act by damaging the schistosome tegument. Although the precise mechanism of action is not fully understood, antimicrobial peptides are generally assumed to kill target cells by disrupting the cell membrane(s) [9] [10] [44]. The DS 01 assayed in this study induced killing of *S. mansoni* and tegument disruption.

Most of the peptides of the dermaseptin family have a very broad range of antimicrobial activity [14]. The capacity of the dermaseptins to discriminate between mammalian and microbial cells is known for almost two decades [19] [45-47], and it is mainly due to the amino acid composition of the peptides and to the differences on the physical-chemical properties of membranes [45] [46] [48] [49].

As stated previously, the dermaseptin family of peptides may have potential use as therapeutic drugs, as they are not toxic to animals or plants. Consistent with the data reported above where the *in vitro* schistosomicidal activity of DS 01 was demonstrated, combined with its effect on reproductive fitness and tegumental alteration on adult worms, it is clear that these peptides are a promising antihelminthic agents. Further biological *in vitro* and *in vivo* studies are required to evaluate its suitability for designing novel antiparasitic agents.

Acknowledgments. – The authors thank Mr. *Alexsander S. Souza* for his excellent technical assistance with confocal microscopy, and MSc *Leonardo S. Carvalho* for correcting the English. This investigation received financial support from *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo* (FAPESP, Brazil) and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq, Process number 476700/2009-4). This paper is dedicated to the memory of Dra. Toshie Kawano, who died on March 30, 2010. Kawano will be remembered by students, faculty, and co-workers alike as an accomplished scientist, dedicated teacher, inspiring mentor, and loyal friend. We, the people of the Laboratory of Parasitology, will honor her by continuing the research that brought so much joy to her life.

Experimental Part

Peptide Synthesis. The dermaseptin 01 (Fig. 1B), which was first identified in skin secretion from tree frogs *Phyllomedusa oreades* (Fig. 1A) [16], was also characterized from *P. hypochondralis* [20]. It was synthesized by an automated bench-top simultaneous multiple solid-phase peptide synthesizer (PSSM 8 system from Shimadzu) was used for the solid-phase synthesis of all the peptides by the Fmoc-procedure [50]. The final peptides were deprotected

in trifluoroacetic acid (TFA) and purified by semipreparative system of the High Performance Liquid Chromatography (HPLC) using an Econosil C₁₈ column (10 μ, 22.5x250 mm) and a two-solvent system: (A) trifluoroacetic acid (TFA)/H₂O (1:1000) and (B) TFA/acetonitrile /H₂O (1:900:100). The column was eluted at a flow rate of 5 ml/min with a 10-60% gradient of solvent B over 30 or 45 min. Analytical HPLC was performed using a binary HPLC system with a SPD-10AV Shimadzu UV-Vis detector (Shimadzu, Kyoto, Japan), coupled to an Ultrasphere® C₁₈ column (5 μ, 4.6 x 150 mm) (Beckman instruments, Berkeley, CA, USA) which was eluted with solvent systems A1 (H₃PO₄/H₂O, 1:1000) and B1 (acetonitrile/ H₂O/H₃PO₄, 900:100:1) at a flow rate of 1.0 ml/min and a 10-80% gradient of B1 over 20 min. The HPLC column eluates were monitored by their absorbance at 220 nm. Molecular weight and purity of synthesized peptides were checked by MALDI-TOF mass spectrometry (Bruker Daltonics, Germany) or electron spray LC/MS-2010 (Shimadzu Co., Kyoto, Japan).

Parasite. Schistosoma mansoni (BH strain Belo Horizonte, Brazil) worms have been maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and hamsters as hosts at the Parasitology Laboratory (Instituto Butantan, São Paulo, Brazil). Female hamsters, weighing 20 to 22 g, were infected by subcutaneous injection of 150 cercariae. After 7 weeks, adults *S. mansoni* specimens were recovered from hamster by perfusion with RPMI 1640 medium supplemented with heparin [51].

Ethics statement. This study was approved by the Institutional Review Board of Instituto Butantan (approval number: 415/07). All animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the Animals Use Ethics Committee of the University of São Paulo (USP, São Paulo, Brazil) and the Butantan Institute (São Paulo, Brazil); the study was conducted adhering to the guidelines of the institution for animal husbandry.

In vitro studies. *Schistosoma mansoni* worms harvested from hamster were washed in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 200 µg/ml of streptomycin, 200 IU/ml of penicillin (Invitrogen), and Hepes 25 mM. Adult worm pairs (male and female) were incubated in a 24-well culture plate (Techno Plastic Products, TPP) containing 2 ml of the same medium supplemented with 10% heat-inactivated calf serum at 37 °C in 5% CO₂ atmosphere [52]. After 1 to 2 h, dermaseptin was added to the culture, yielding a final drug concentration of 1 to 200 µg/ml [53]. Dermaseptin was dispensed from a stock solution (2000 µg/ml) in RPMI 1640. Worm motor activity, egg output (oviposition), tegumental alterations, and survival of parasites were monitored on daily basis for 5 days using an inverted microscope and a stereomicroscope (SMZ 1000, Nikon) [52]. All experiments were carried out in triplicates and were repeated at least three times.

Tegumental changes. The quantification of the number of tubercles was performed using a confocal microscope. After the established times, or in occurrence of death, the parasites were fixed in Formalin-acetic-alcohol solution (FAA) and analyzed under a confocal microscope (Laser Scanning Microscopy, LSM 510 META, Zeiss) at 488 nm (exciting) and 505 nm (emission) as described [54]. A minimum of three areas of the tegument of each parasite were assessed. The numbers of tubercles were counted in 20,000 µm² of area calculated with the Zeiss LSM Image Browser software.

Statistical analysis. Statistical tests were performed with the GRAPHPAD PRISM (version 4.0) software. Significant differences between means were determined by two-tailed Student's *t*-test.

REFERENCES

- [1] C.H. King, K. Dickman, D.J. Tisch, *Lancet* **2005**, *365*, 1561.
- [2] P. Steinmann, J. Keiser, R. Bos, M. Tanner, J. Utzinger, *Lancet Infect. Dis.* **2006**, *6*, 411.
- [3] B. Gryseels, K. Polman, J. Clerinx, L. Kestens, *Lancet* **2006**, *368*, 1106.
- [4] M. Ismail, S. Botros, A. Metwally, S. William, A. Farghally, L.F. Tao, T.A. Day, J.L. Bennett, *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *60*, 932.
- [5] Y.S. Liang, G.C. Coles, M.J. Doenhoff, V.R. Southgate, *Int. J. Parasitol.* **2001**, *31*, 1227.
- [6] C.R. Caffrey, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2007**, *11*, 433.
- [7] B. Ramirez, Q. Bickle, F. Yousif, F. Fakorede, M.A. Mouries, S. Nwaka, *Expert Opin. Drug Discov.* **2007**, *2*, 53.
- [8] M. Doenhoff, D. Cioli, J. Utzinger, *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2008**, *21*, 659.
- [9] R.E.W. Hancock, D.S. Chapple, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1999**, *43*, 1317.
- [10] K.L. Brown, R.E. Hancock, *Curr. Opin. Immunol.* **2006**, *18*, 24.
- [11] R.M. Epanand, H.J. Vogel, *Biochim. Biophys. Acta* **1999**, *1462*, 11.
- [12] M. Zasloff, *Nature* **2002**, *415*, 389.

- [13] Y. Park, K.S. Hahm, *Biochem. Mol. Biol.* **2005**, *38*, 507.
- [14] P. Nicolas, C.E. Amri, *Biochim. Biophys. Acta* **2009**, *1788*, 1537.
- [15] M. Zasloff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1987**, *84*, 5449.
- [16] G.D. Brand, J.R. Leite, L.P. Silva, S. Albuquerque, M.V. Prates, R.B. Azevedo, V. Carregaro, J.S. Silva, V.C. Sá, R.A. Brandão, C. Jr. Bloch, *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 49332.
- [17] A.C. Rinaldi, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2002**, *6*, 799.
- [18] A. Zairi, F. Tangy, K. Bouassida, K. Hani, *J. Biomed. Biotechnol.* **2009**, *2009*, 452567.
- [19] A. Mor, K. Hani, P. Nicolas, *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 31635.
- [20] G.D. Brand, J.R. Leite, S.M. de Sá Mandel, D.A. Mesquita, L.P. Silva, M.V. Prates, E.A. Barbosa, F. Vinecky, G.R. Martins, J.H. Galasso, S.A. Kuckelhaus, R.N. Sampaio, J.R. Furtado Jr, A.C. Andrade, C. Jr. Bloch, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *347*, 739.
- [21] O. Lequin, A. Ladram, L. Chabbert, F. Bruston, O. Convert, D. Vanhoye, G. Chassaing, P. Nicolas, M. Amiche, *Biochemistry* **2006**, *45*, 468.
- [22] P.J. Coote, C.D. Holyoak, D. Bracey, D.P. Ferdinando, J.A. Pearce, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998**, *42*, 2160.

- [23] A.J. De Lucca, J.M. Bland, T.J. Jacks, C. Grimm, T.J. Walsh, *Med. Micol.* **1998**, 36, 291.
- [24] J.R. Leite, G.D. Brand, L.P. Silva, S.A. Kückelhaus, W.R. Bento, A.L. Araújo, G.R. Martins, A.M. Lazzari, C. Jr. Bloch, *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **2008**, 151, 336.
- [25] A. Belaid, M. Aouni, R. Khelifa, A. Trabelsi, M. Jemmali, K. Hani, *J. Med. Virol.* **2002**, 66, 229.
- [26] V.G. Chinchar, L. Bryan, U. Silphadaung, E. Noga, D. Wade, L. Rollins-Smith, *Virology* **2004**, 323, 268.
- [27] C. Lorin, H. Saidi, A. Belaid, A. Zairi, F. Baleux, H. Hocini, L. Bélec, K. Hani, F. Tangy, *Virology* **2005**, 334, 264.
- [28] M.F. Zampa, I.M. Araújo, V. Costa, C.H. Nery Costa, J.R.Jr. Santos, V. Zucolotto, C. Eiras, J.R. Leite, *Nanomedicine*, **2009**, 5, 352.
- [29] A. Dagan, L. Efron, L. Gaidukov, A. Mor, H. Ginsburg, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, 46, 1059.
- [30] R. Feder, R. Nehushtai, A. Mor, *Peptides* **2001**, 22, 1683.
- [31] J. Keiser, *Parasitology* **2010**, 137, 589.

- [32] L. Pica-Mattoccia, D. Cioli, *Int. J. Parasitol.* **2004**, *34*, 527.
- [33] L. Sanderson, A. Bartlett, P.J. Whitfield, *J. Helminthol.* **2002**, *76*, 241.
- [34] M.L. De Oliveira Penido, P.M. Zech Coelho, R.T. de Mello, D. Piló-Veloso, M.C. de Oliveira, J.R. Kusel, D.L. Nelson, *Acta Trop.* **2008**, *108*, 249.
- [35] S.C. De Araújo, A.C. de Mattos, H.F. Teixeira, P.M. Coelho, D.L. Nelson, M.C. de Oliveira, *Int. J. Pharm.* **2007**, *337*, 307.
- [36] Y. Mitsui, M. Miura, Y. Aoki, *J. Helminthol.* **2009**, *83*, 7.
- [37] L.G. Magalhães, C.B. Machado, E.R. Morais, E.B. Moreira, C.S. Soares, S.H. da Silva, A.A. da Silva Filho, *Parasitol. Res.* **2009**, *104*, 1197.
- [38] L.G. Magalhães, G.J. Kapadia, L.R. da Silva Tonuci, S.C. Caixeta, N.A. Parreira, V. Rodrigues, A.A. da Silva Filho, *Parasitol. Res.* **2010**, *106*, 395.
- [39] A.M. Mohamed, N.M. Metwally, S.S. Mahmoud, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2005**, *100*, 205.
- [40] X. Shuhua, S. Binggui, J. Chollet, M. Tanner, *Acta Trop.* **2000**, *76*, 107.

- [41] S. William, S. Botros, M. Ismail, A. Farghally, T.A. Day, J.L. Bennett, *Parasitology* **2001**, *122*, 63.
- [42] T. Manneck, Y. Haggemüller, J. Keiser, *Parasitology* **2010**, *137*, 85.
- [43] X. Shuhua, S. Binggui, J. Chollet, J. Utzinger, M. Tanner, *J. Parasitol.* **2000**, *86*, 1125.
- [44] H.W. Huang, *Biochemistry* **2000**, *39*, 8347.
- [45] J.W. Daly, J. Caceres, R.W. Moni, F. Gusovsky, M. Jr. Moos, K.B. Seamon, K. Milton, C.W. Myers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1992**, *89*, 10960.
- [46] A. Mor, V.H. Nguyen, A. Delfour, D. Migliore-Samour, P. Nicolas, *Biochemistry* **1991**, *30*, 8824.
- [47] A. Mor, P. Nicolas, *Eur. J. Biochem.* **1994**, *219*, 145.
- [48] P. La Rocca, Y. Shai, M.S. Sansom. *Biophys. Chem.* **1999**, *76*, 145.
- [49] S.H. White, W.C. Wimley, *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, *1376*, 339.
- [50] E. Atherton, R.C. Sheppard, 'Solid phase peptide synthesis: a practical approach, Oxford, England: IRL Press, 1989.
- [51] S.R. Smithers, R.J. Terry, *Parasitology* **1965**, *55*, 695.

[52] S.H. Xiao, J. Keiser, J. Chollet, J. Utzinger, Y. Dong, Y. Endriss, J.L. Vennerstrom, M. Tanner, *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1440.

[53] S.H. Xiao, B.A. Catto, *Antimicrob. Agents Chemother.* **1989**, *33*, 1557.

[54] J. Moraes, M.P. Silva, F.P. Ohlweiler, T. Kawano, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **2009**, *51*, 77.

Table 1. In vitro effects of dermaseptin 01 on 49-day-old adult *Schistosoma mansoni*

Dermaseptin 01 ($\mu\text{g/ml}$)	Incubation of period (h)	Dead worms (%) ^a	Motor activity reduction (%) ^a		Worms with tegumental alterations (%) ^a	
			Slight	Significant	Partial	Extensive
0	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	0	0	0	0
	120	0	0	0	0	0
25	24	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0
	96	0	20	0	0	0
	120	0	60	0	0	0
50	24	0	0	0	0	0
	48	0	50	0	0	0
	72	50	50	50	0	0
	96	60	40	60	0	0
	120	100	0	100	20	0
100	24	0	60	40	100	0
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
150	24	40	50	50	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100
200	24	100	0	100	0	100
	48	100	0	100	0	100
	72	100	0	100	0	100
	96	100	0	100	0	100
	120	100	0	100	0	100

^a) Percentages relative to the 20 worms investigated. Pairs of adult worms were incubated in 24-well culture plate containing RPMI 1640 medium and treated with DS 01 at different concentration during time periods indicated. Worm motor activity and survival of the parasites were monitored under a stereomicroscope. Tegumental alterations were monitored under an inverted microscope and a confocal microscope.

Legends to Figures

Figure 1. *Biological source and bioactive peptide.* (A) Adult male of *Phyllomedusa oreades* (Spix, 1824). (B) Helix-Wheel plots of the antimicrobial peptide (dermaseptin 01) showing the amphiphilic character of the molecule. The residues represented by pentagons, diamonds, circles, and triangles are positively charged, aliphatic, polar uncharged and negatively charged side chains, respectively. The amino acid side chains are projected down the axis of the alpha helix (orthogonal to the plane of the page). As an ideal alpha helix consists of 3.6 residues per complete turn, the angle between two residues is chosen to be 100 degrees.

Figure 2. *In vitro effect of dermaseptin 01 on the survival of Schistosoma mansoni.* Pairs of adult worms, males (closed bars) and females (open bars), were incubated in a 24-well culture plate containing RPMI 1640 medium and treated with dermaseptin 01 at different concentration during time periods indicated. Mortality data are presented from ten worm couples.

Figure 3. *In vitro effect of dermaseptin 01 on egg laying by Schistosoma mansoni.* Adult worm couples were incubated in a 24-well culture plate containing RPMI 1640 medium and treated with dermaseptin 01 at different concentration. At the time periods indicated, the cumulative number of eggs by each worm couple was assessed and scored using an inverted microscope. Values are means \pm SD (bars) of ten worm couples.

Figure 4. *Effect of dermaseptin 01 on the tegument of Schistosoma mansoni.* Pairs of adult worms were incubated in a 24-well culture plate containing RPMI 1640 medium and treated with dermaseptin 01 at different concentration. After 48 hours of incubation with peptide, adult male worms were fixed in FAA solution and fluorescent images were obtained using

confocal microscopy. (A and B) Control. (C and D) Dermaseptin 50 $\mu\text{g/ml}$. (E and F) Dermaseptin 100 $\mu\text{g/ml}$. (G and H) Dermaseptin 150 $\mu\text{g/ml}$. (I and J) Dermaseptin 200 $\mu\text{g/ml}$. Left images (bars = 200 μm). High images showing higher magnification of the tegumental surface of male worms (bars = 50 μm). The images were analyzed with the Zeiss LSM Image Browser software.

Figure 5. *Effect of dermaseptin 01 on tubercles of Schistosoma mansoni male worms.* Pairs of adult worms were incubated in a 24-well culture plate containing RPMI 1640 medium and treated with dermaseptin 01 at different concentration. After occurrence of death, adult male worms were fixed in FAA solution. The quantification of the number of tubercles was performed using confocal microscopy. Indicated are numbers of intact tubercles and these numbers were measured in a 20,000 μm^2 of area calculated with the Zeiss LSM Image Browser software. A minimum of three tegument areas of each parasite were assessed. Values are means \pm SD (bars) of ten adult male worms.

Figure 1



B GLWSTIKQKKGKEAAIAAKAAGQAALGAL-NH2

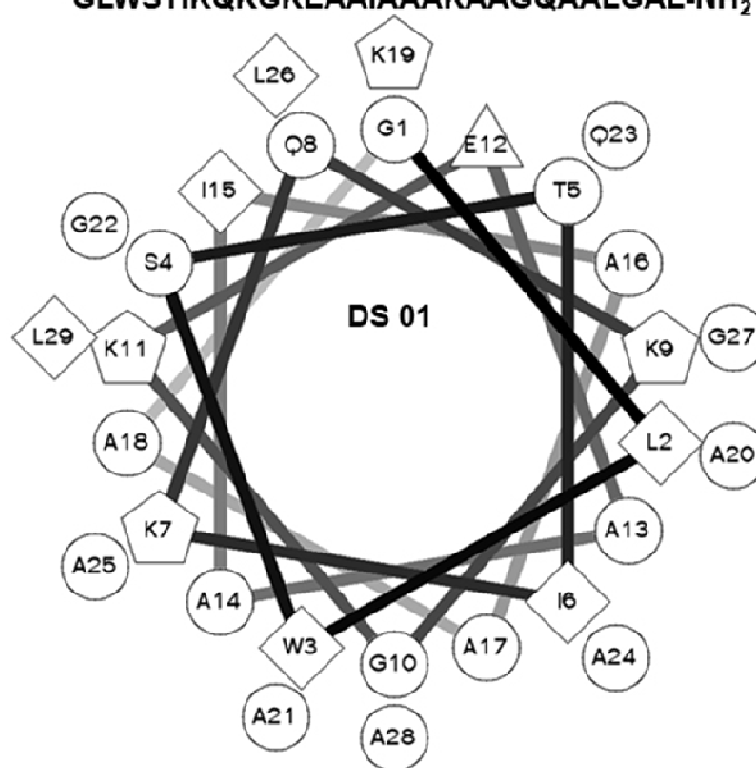


Figure 2

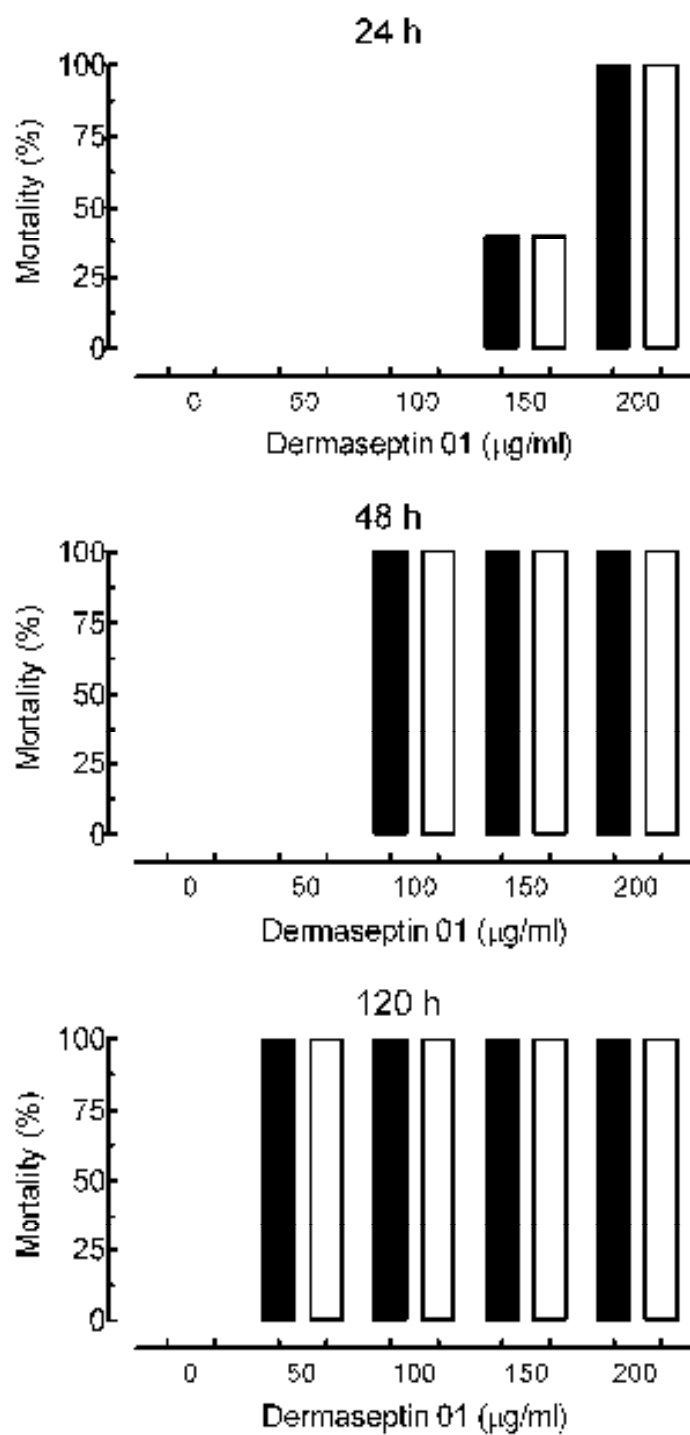


Figure 3

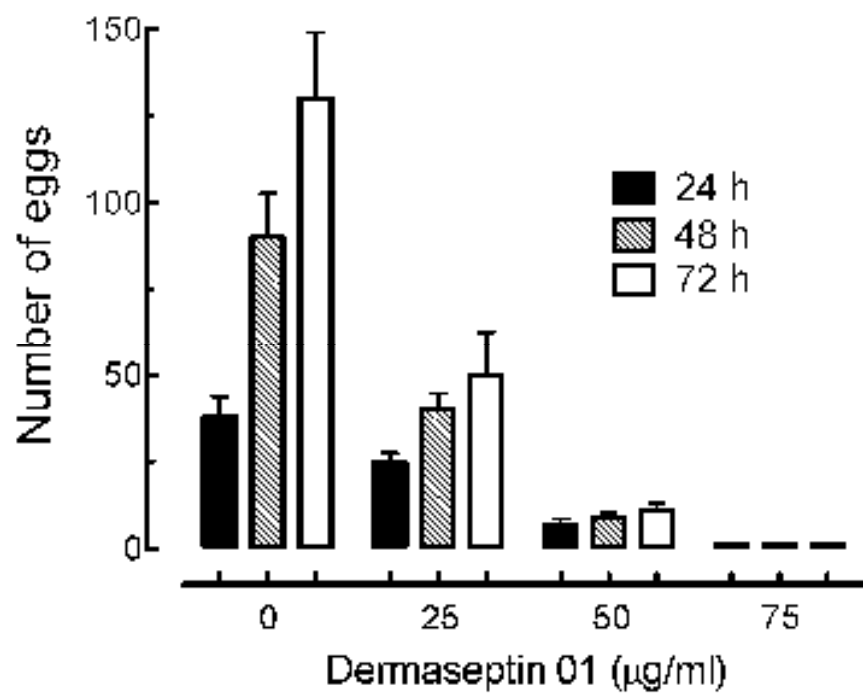


Figure 4

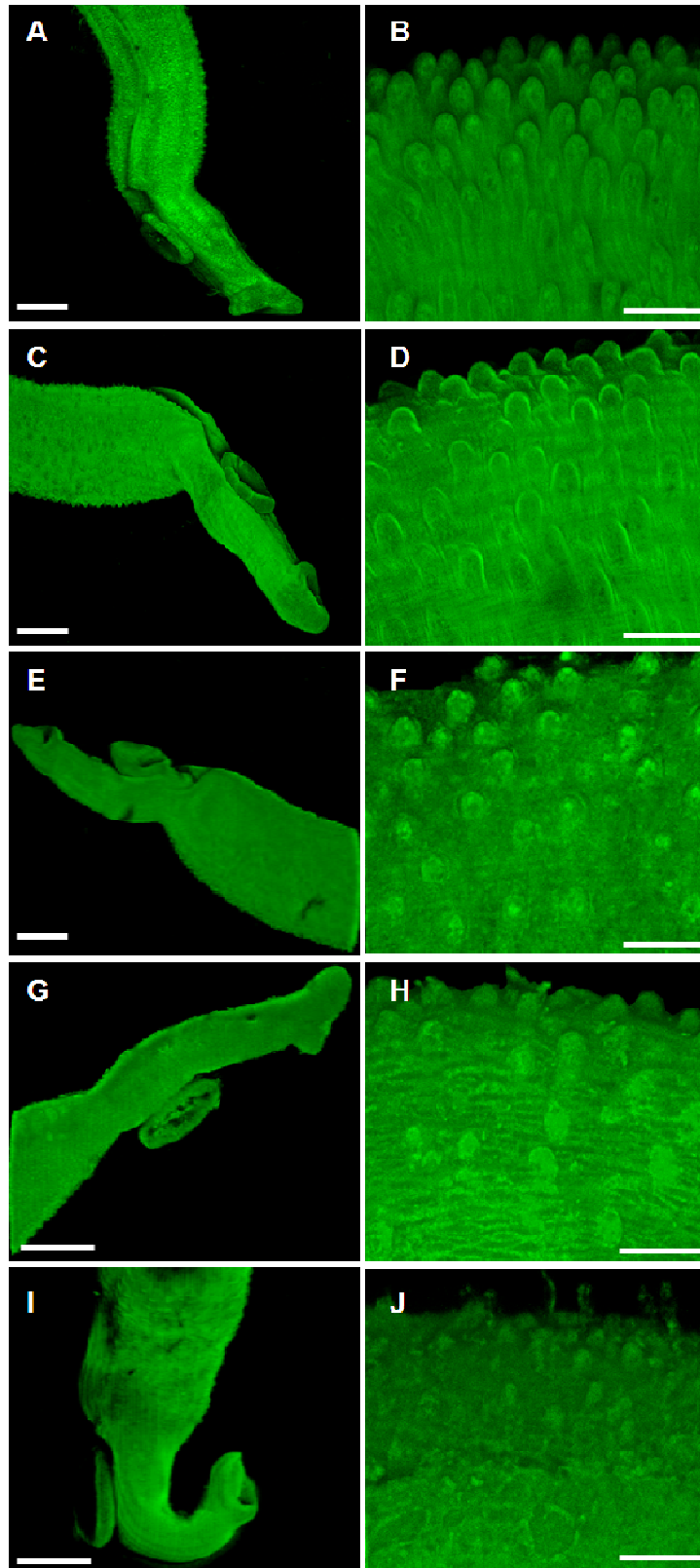
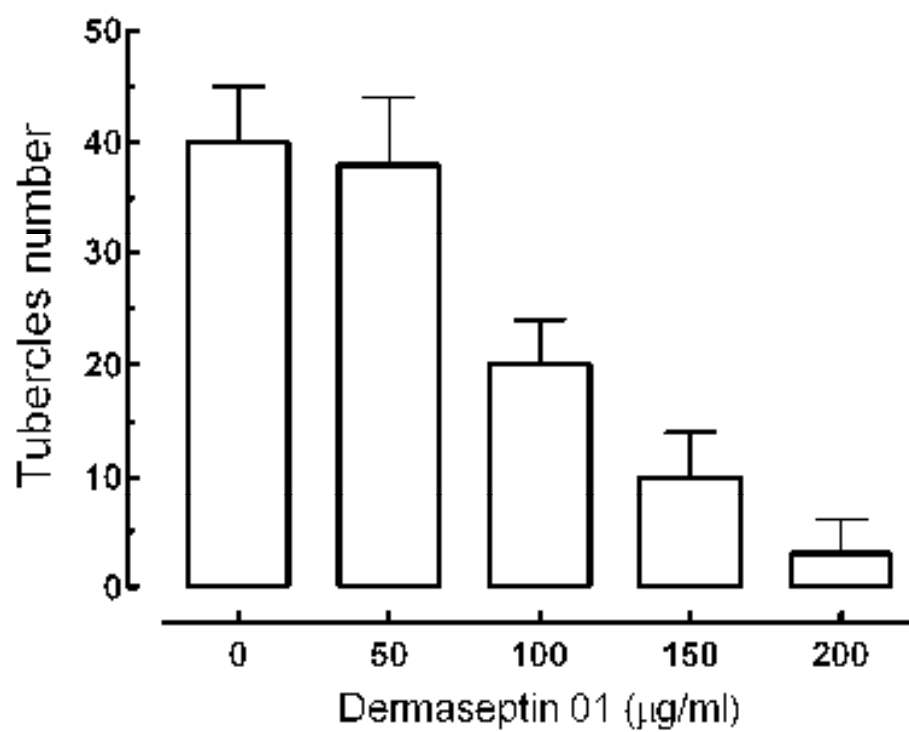


Figure 5



ANEXO - C

Evaluation of the in vitro activity of epiisopiloturin alkaloid isolated from jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) against *Schistosoma mansoni* and *Leishmania amazonensis*

Evaluation of the *in vitro* activity of Epiisopiloturin Alkaloid isolated from Jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Holm.; Rutaceae) against *Schistosoma mansoni* and *Leishmania amazonensis*

Leiz Maria Costa Veras Miura^{1,2}, David Fernandes Lima^{3,4}, Josué de Moraes⁵, Sabrina Maria Portela Carneiro^{6,7}, Guilherme Dotto Brand^{1,8}, Toshie Kawano⁵, Fernando Aécio de Amorim Carvalho⁶, Carlos Bloch Júnior⁸, Maria do Carmo de Souza Batista⁹, José Roberto de Souza Almeida Leite^{1,*}.

¹Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Biotec, *Campus* Ministro Reis Velloso, CMRV, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Parnaíba, Piauí, PI, Brasil;

²Programa de Mestrado em Ciência Animal, Centro de Ciências Agrárias, CCA, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, Piauí, PI, Brasil;

³VEGEFLORA Extrações do Nordeste, Parnaíba, Piauí, PI, Brasil;

⁴Programa de mestrado em Farmacologia, Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, PI, Brasil;

⁵Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brasil;

⁶Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, PI, Brasil;

⁷Programa de doutorado Rede Biotecnologia do Nordeste, Fortaleza, Ceará, CE, Brasil;

⁸Laboratório de Espectrometria de Massa, LEM, Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil;

⁹Laboratório de Morfofisiologia Veterinária, Centro de Ciências Agrárias, CCA, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Teresina, PI, Brasil.

*Corresponding Author: José Roberto S. A. Leite

Phone number: +55 86 3315-5525

e-mail: jrleite@ufpi.br and jrsaleite@gmail.com

Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, Biotec, *Campus* Ministro Reis Velloso, CMRV, Universidade Federal do Piauí, UFPI, Parnaíba, Piauí, PI, Brasil.

Abstract

Neglected tropical diseases such as schistosomiasis and leishmaniasis continue to cause significant morbidity and mortality in the developing countries, reinforcing the demand for the development of novel drugs. Here we report the schistosomicidal and leishmanicidal activities of epiisopiloturin, an imidazolic alkaloid extracted from the leaves of *Pilocarpus microphyllus*, known as jaborandi. This compound was isolated by high performance liquid chromatography (HPLC) and had its chemical structure confirmed by ion-trap mass spectrometry. It had significant *in vitro* activity against adult *Schistosoma mansoni* and *Leishmania amazonensis* amastigotes and no detectable cytotoxicity to peritoneal macrophage cells. It is the first time that epiisopiloturin is reported as a promising schistosomicidal and leishmanicidal agent.

Key words: Epiisopiloturin; Alkaloid; *Leishmania amazonensis*; *Schistosoma mansoni*.

1. Introduction

Pilocarpus microphyllus (Rutaceae family) is originally from the Amazon and Cerrado regions of Brazil where it is known as jaborandi. This plant is a rich source of imidazole alkaloids such as pilocarpine, isopilocarpine (the C[3]-epimer of pilocarpine), pilosinine (2R,3R,6S), isopilosine (2S,3R,6R), epiisopilosine (2S,3R,6S) and epiisopiloturin (Sawaya et al., 2008; Voigtlander et al., 1978). Pilocarpine is the best known of the jaborandi alkaloids and the only one with commercial value, used both as a miotic and diaphoretic agent due to its action as a peripheral stimulant of the parasympathetic system (Davies et al., 2009; Abreu et al., 2005; Sawaya et al., 2008).

However, from this set of structurally related molecules, only pilocarpine has a defined biological activity (Davies et al., 2009; Voigtlander et al., 1978). Imidazole alkaloids display a wide range of pharmacological activities (Barradas et al., 2008). They have been used as antiparasitic, antibacterial, antimicobacterial, antitumoral, antioxidant and antifungal agents (Hadj-Esfandiari et al., 2007; Khabnadideh et al., 2003, Mallia et al., 2006; Olender et al., 2009; Walczak et al., 2004;).

This indicates that the alkaloid extract of jaborandi leaves harbor a still unexplored set of molecules with potential application in human health, such as putative antimicrobial compounds that can be further developed in alternative treatments for infectious diseases (Camargo, 2008). There is an increasing demand for novel drugs in developing countries, especially for the treatment of “neglected tropical diseases” (NTDs), known to affect more than 1 billion people, about one-sixth of the world’s population, are infected with one or more of 13 NTDs (WHO, 2009). NTDs have a terrible impact on health, impede child growth and development, harm pregnant women, and often cause long-term debilitating illnesses. They cause an extraordinary amount of ill health, disability and disfigurement, and are often deadly (WHO, 2009).

Leishmaniasis is a neglected tropical parasitic disease characterized by the infection of macrophages by obligate intracellular parasites of the genus *Leishmania*. It has been considered as a major health problem worldwide, especially in developing nations (Rocha et al., 2005). Globally, there are an estimated 1.5–2 million new cases and 70 000 deaths each year, and 350 million people are at risk of infection and disease. Morbidity and mortality because of the leishmaniases cause an estimated 2-4 million disability-adjusted life-years (Murray, 2005).

The inexistence of a vaccine places an urgent demand for more effective drugs to replace/supplement those in current use. Most of the clinically used drugs for the

treatment of leishmaniasis are based on pentavalent antimony compounds and were developed before 1959 (Dunning, 2009). Generally, these drugs have one or more limitations, like unaffordable cost, difficulty in administration, toxicity or more importantly the development of resistant parasites. Alternative drugs, such as amphotericin B and pentamidine, also have unpleasant side effects (Kedzierski et al., 2009).

Schistosomiasis also represents a serious health problem in tropical and subtropical countries. An estimated total of 207 million people are infected worldwide, while 779 million people remain under infection risk (Steinmann et al., 2006). The current treatment is based on the use of praziquantel (PZQ), a non-expensive anthelmintic drug highly effective against all schistosomes species those infecting humans. However, the parasite treatment based on the use of only one drug causes serious concerns regarding development resistance. Therefore, the development of novel and effective schistosomicidal compounds are highly desirable (Caffrey, 2007; Doenhoff et al., 2008).

The development of resistance to these alkaloids and toxicity to the host have been reported (Melo et al., 2003). Plant extracts or plant-derived compounds are likely to provide a valuable source of novel medicinal agents (Kayser and Kiderlen, 2001).

The present work describes the purification, characterization, and potential application of the alkaloid epiisopiloturin, extracted from jaborandi leaves, as a leishmanicidal and schistosomicidal agent.

2. Material and methods

2.1. Plant material

The plant material was collected from a specimen of *Pilocarpus microphyllus* growing under greenhouse conditions at the Matias Olímpio (Piauí, Brazil), and it was identified by Ivanilza Moreira de Andrade, Ph. D. The voucher specimen was deposited at the Graziella Barroso Herbarium of the Teresina, Piauí and Brazil (TEPB 27.152 Tomber number).

2.1. Extraction and purification of alkaloid epiisopiloturin.

The alkaloid epiisopiloturin was purified from the biomass generated by the production of pilocarpine held by VEGEFLORA Extrações do Nordeste Ltda. The biomass was subjected to an extraction process for alkaloids based on acidification and filtration of industrial waste followed by the alkalization and filtering of the solution to obtain concentrated epiisopiloturin (Costa, 1999). Solutions were filtered with 0.45 μm pore membranes and injected into a high performance liquid chromatographer, HPLC (Shimadzu Prominence, AUTOSAMPLER SIL-10AF, CTO-20A, LC-6AD, CBM-20A, SPD-20A). The column used was Merck LiChrospher 60 RP Select B (5 μm) and mobile phase consisted of 5% (v/v) potassium phosphate at pH 2.5 at a flow rate of 1 mL/min at 50°C. HPLC detector was set to 216 nm. Mass spectrometry was used to evaluate the purity and monoisotopic molecular mass of epiisopiloturin (HCT Ultra PTM ETD II from Bruker Daltonics (Bremen, Germany). Mass spectra were acquired in a mass range of m/z 70 to 300 Da. MS2 was carried out in manual mode with fragmentation of the precursor ion by CID using He as the collision gas. Precursor ions were selected within an isolation width of 2 u and scans were accumulated with variable RF signal amplitudes. The m/z scale of the mass spectrum was calibrated using the external calibration standard G2421A electrospray “tuning mix” from Agilent Technologies (Santa Rosa, CA, USA).

2.2. Anti-leishmania assay

2.2.1. *Leishmania* promastigotes

The IFLA/BR/67/PH-8 strain of *Leishmania amazonensis*, originally isolated from a human case of diffuse cutaneous leishmaniasis, was used in the present study. This strain has been maintained in Warren's medium (brain–heart infusion plus haemin and folic acid) supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco Invitrogen Corporation, New York, U.S.A) at 28 °C in a tissue flask, as previously described by Lima et al., 2000.

Leishmania amazonensis IFLA/BR/67/PH-8 was cultivated in 96 well microplates in the presence of serial dilutions (ranging from 2 to 128 µg/mL) of the epiisopiloturin alkaloid diluted in Schneider medium (Sigma MRC) the addition of 2% dimethyl sulfoxide (DMSO). As negative and positive controls, respectively, were used DMSO at 2% and amphotericin B at 3% in culture medium. The concentration of promastigotes placed on each well was 10⁶ cells. Microplates were incubated in the Biochemical Oxygen Demand (B.O.D) at 26 °C and cell counts were performed after 24 and 48 hours in hemocytometer (Neubauer, improved double, Superior Ltd, Germany).

2.2.2. Peritoneal macrophages.

Macrophages were removed from the peritoneum of Swiss female mice, after the inoculation of 10 mL sterile Phosphate Buffered Saline (PBS) followed by abdominal massage. Macrophages were collected and washed three times with sterile PBS, centrifuged at 1.0 x 10³ rpm for ten minutes and then resuspended in culture medium (RPMI 1640 from Sigma). Subsequently, 5 x 10⁵ cells were seeded to adhere to a 24 wells culture plate and left overnight at 5% CO₂, 37 °C, followed by the addition of 500 µL of RPMI 1640 on each well. Roughly 5 x 10⁶ promastigotes were added to each well, resulting in 1:10 macrophages/leishmania and incubated for 4 hours at 37°C in 5% CO₂.

Wells were then washed with PBS to remove the free parasites. Epiisopiloturin in RPMI medium was added to wells containing infected macrophages at 128, 16 and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in triplicate and incubated for 48 hours. After incubation, the and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in triplicate and incubated for 48 hours. After incubation, the samples were aspirated, washed in PBS and the cover slip were stained by panoptic method (Laborclin). After the treatment with epiisopiloturin, the number of infected macrophages and the number of parasites per macrophage were calculated, using a sample size of 100 macrophages. The total number of associated amastigotes (association index) and total number of internalised amastigotes (phagocytic index) by 100 macrophages were quantified. The percentage of associated amastigotes that are also internalized was determined (Escaron et al., 2007).

2.3. Citotoxic effects of epiisopiloturin to peritoneal cells.

The toxicity of epiisopiloturin to mammalian cells was estimated using peritoneal mice cells, predominantly macrophages. Cells were obtained by washing the peritoneal cavity of mice with 10 mL cold sterile PBS at pH 7.2 followed by centrifugation at 1.0×10^3 rpm at 4°C for 10 minutes and quantification with trypan blue in PBS pH 7.2 in hemocytometer (viability above 95%). Viable cells (2.5×10^4) were cultured in 96 well microplates for 1 hour with different concentrations of epiisopiloturin (from 1 to 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at 37°C and 5% CO_2 . Cell viability was assessed using the method of Mosmann (1983), which is based on the capacity of mitochondrial dehydrogenase enzyme from viable cells to cleave the pale yellow tetrazolium rings of MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolio bromide] (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) producing dark blue crystals. The release of crystals was obtained by adding 50 μL 10% sodium dodecyl

sulfate (Sigma-Aldrich, St Louis, USA) and quantification was carried out by colorimetric spectrophotometry assay at 550 nm.

2.4. Anti-helminthes assay.

2.4.1 Parasite.

Schistosoma mansoni (BH strain Belo Horizonte, Brazil) worms have been maintained in *Biomphalaria glabrata* snails and *Mesocricetus auratus* hamsters hosts at the Parasitology Laboratory (Butantan Institute, São Paulo, Brazil).. Female hamsters, weighting 20 to 22 g, were infected by subcutaneous injection of 150 cercariae. After 9 weeks, adult *S. mansoni* specimens were recovered from the hamsters by perfusion with the RPMI 1640 medium supplemented with heparin (Smithers and Terry, 1965). The experimental protocols were authorized by Ethical Committee for Animal Experimentation of the University of São Paulo (USP, São Paulo, Brazil) and the Butantan Institute (São Paulo, Brazil).

2.4.2. In vitro studies with *Schistosoma mansoni*.

Schistosoma mansoni worms harvested from hamsters were washed in RPMI 1640 medium (Gibco) supplemented with 200 µg/ml streptomycin, 200 IU/ml of penicillin (Invitrogen), and 25 mM of HEPES. Adult worm pairs (male and female) were incubated in 24-well culture plate (Techno Plastic Products, TPP) containing 2 mL of the same medium supplemented with 10% heat-inactivated calf serum at 37 °C and at 5% CO₂ atmosphere (Xiao et al., 2007). After 2 hours, epiisopiloturine was added to the culture, yielding a final drug concentration of 50 to 200 µg/mL (Shuhua and Catto, 1989). The control worms were assayed in RPMI 1640 medium with 2% DMSO as a negative control group and in 10 µM PZQ as a positive control group. All experiments were

carried out in triplicates. Worm motility, tegumental alterations, and the survival of the parasites were monitored on daily basis for 5 days using an inverted microscope and a stereomicroscope (SMZ 1000, Nikon).

2.4.3. Tegumental changes.

Quantification of the number of tubercles of helminthes was performed using a confocal microscope. After established times or in the occurrence of death, parasites were fixed in Formalin-Acetic-Alcohol solution (FAA) and analyzed under confocal microscopy (Laser Scanning Microscopy, LSM 510 META, Zeiss) at 488 nm (exciting) and 505 nm (emission) as described by Moraes et al. (2009). A minimum of three areas (20,000 μm^2) of the tegument of each parasite was assessed. Numbers of intact tubercles was noted and calculated with the Zeiss LSM Image Browser software.

2.5. Statistical Analysis

ANOVA and Kruskal–Wallis tests were used to compare multiple normal or non-normal samples, respectively. Student's t-test and Mann–Whitney test were used to compare two normal or non-normal samples, respectively. The BioEstat 5.0 software package (Belém, Brazil, 2007) was used for performing the statistical tests and for graphical representations.

3. Results and Discussion

The RP-HPLC (High Performance Liquid Chromatography) purification of the alkaloid extract of jaborandi leaves resulted in several fractions, one of them identified by electrospray ion trap mass spectrometry as epiisopiloturin ($[\text{M}+\text{H}^+] = 287.061$). The

fragmentation pattern of this molecule confirmed its structure as identical to that described by Voigtlander et al. (1978) using C-RMN (Figure 1).

In vitro assays revealed that epiisopiloturin has significant leishmanicidal activity to the amastigote form of *Leishmania amazonensis* IFLA/BR/67/PH-8. Epiisopiloturin at a concentration of 128 µg/mL lowered the association index between peritoneal macrophages and *L. amazonensis* significantly in the control group (Figure 2 A, 2B, 2C, and 2D). However, it did not produce detectable mortality to the promastigote form in the assayed concentrations (data not show).

This is probably due to the morphological and biochemical plasticity of the two forms presented by the parasite, including a differential energy metabolism and transport across membranes (Killick and Rioux, 1991). Most of the drug-screening experiments against *Leishmania* have been performed on promastigotes and not on the amastigotes, which is the actual parasitic phase that causes the infection in humans and dogs (Baneth and Shaw, 2002; Ordóñez-Gutiérrez et al., 2007). It is not possible at the moment to determine the reason for the epiisopiloturin selectivity, due to its unknown mechanism of action. However, azoles are known to inhibit the growth of *Leishmania* amastigotes by preventing the cytochrome P-450-mediated 14- α -demethylation of lanosterol, blocking ergosterol synthesis and causing accumulation of 14- α -methyl sterols (Srinivas et al., 2009). Sterol biosynthesis inhibitors offer an attractive possibility, as *Leishmania* parasites synthesize specific sterols which seem to be essential for cell proliferation and viability (Chance, 1995).

The cytotoxicity of epiisopiloturin to peritoneal macrophage cells was evaluated. The number and viability of macrophage peritoneal cells adhered to sample wells after incubation with the alkaloid up to a concentration of 128 µg/mL did not differ significantly to the control (Figure 3). This is in agreement with other imidazole

compounds that did not demonstrate strong toxic actions to mammalian cells (acute toxicity and cytotoxicity) (Kowalska-Pylka et al., 2001). However, some azoles have high toxicity to the kidneys and liver, such as ketoconazole, a typical azole compound binds to mammalian P450 enzymes, including P4503A4 and several steroid hydroxylases (Billaud et al., 2009).

A number of side-effects are associated with ketoconazole as a result of inhibition of these mammalian enzymes (Venkatakrisnan et al., 2000). Ketoconazole leads to liver damage due to its ability to inhibit P4503A4, the major P450 isoform of the liver (Cupp-Vickery et al., 2001).

The effect of epiisopiloturin on adult worms of *S. mansoni* was evaluated alterations in motor activity and in the tegument of the helminthes after incubation with increasing concentrations of the alkaloid, as shown in Table 1. After 120 h of incubation, the worms of the negative control groups maintained normal movement with no detectable alterations. As shown in Table 1, all adult worms were dead after 72 and 120 h of incubations with epiisopiloturin at a concentration of 200 and 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively (Table 1). Worms incubated with epiisopiloturin at 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showed decreased motor activity without tegumental alterations worms incubated with epiisopiloturin at 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ showed Decreased motor activity without tegumental alterations in many individuals after 72 of incubation. However, the group 13 treated with 2.0% DMSO, did not significantly decrease the worm viability in comparison with the positive (PQZ) control group.

Morphological alterations of the tegument on the *S. mansoni* surface were detected at an epiisopiloturin concentration of 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A pattern consisting of a combination of changes in surface morphology were detected and correlated to the death of the worms (Figure 4). For the extraction of quantitative parameters, an area of

20,000 μm^2 was demarcated and healthy tubercles were counted (Figure 5). Even at concentrations that induced the parasites death, motility and morphological changes in the surface could be detected.

The analysis by laser scanning confocal microscopy was efficient to detect alterations in the surface of the parasite, in the right column of Figure 4, we can see in detail the changes in tubercles associated with increasing concentrations of the alkaloid. In previous works, similar techniques were used to evaluate effects of drugs.

The mechanism by which epiisopiloturin imidazole alkaloid exerts its *in vitro* schistosomicidal effect is not clear, but our results indicate that epiisopiloturin possesses activity against adult worms. Our results indicated that epiisopiloturin against *in vitro* leishmanicidal and schistosomicidal activities with irrelevant toxicity activity against mammalian cells. Thus, epiisopilotutin is a promising compound that could be used as lead compound for the development of new antiparasitic agents. Further biological *in vitro* and *in vivo* studies are required to evaluate its suitability for designing novel antiparasitic agents.

Acknowledgments

The authors thank EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia, Pós-Graduação em Ciência Animal (Universidade Federal do Piauí - UFPI), VEGEFLOREX Extrações do Nordeste LTDA, Rede Nanobiomed (Nanobiomedicine Network Capes Brasil) and FINEP Campus Regionais 2007 programs for partially funding the project. We are grateful to Alexander Seixas de Souza, for excellent technical assistance; to Saulo Martins de Sá Mandel for the valuable comments on the manuscript.

References

Abreu, I.N., Sawaya, A.C.H.F., Eberlin, M.N., Mazzafera, P., 2005. Production of pilocarpine in callus of jaborandi (*Pilocarpus microphyllus* Staph.). *In vitro* cellular & developmental biology plant 41, 806- 811.

Barradas, J.S., Errea, M.I., D'Accorso, N.B., Sepúlveda, C.S., Talarico, L.B., Damonte, E.B., 2008. Synthesis and antiviral activity of azoles obtained from carbohydrates. *Carbohydrate research* 2468–2474.

Baneth, G., Shaw, S.E., 2002. Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Veterinary parasitology* 106, 315–24.

Billaud, E.M. Antoine, C. Berge, M. Abboud, I. Lefeuvre, S. Benammar, M. Glotz, D., 2009. Management of Metabolic Cytochrome P450 3A4 Drug-Drug Interaction between Everolimus and Azole Antifungals in a Renal Transplant Patient. *Clinical Drug Investigation* 29, 481-486.

Caffrey, C.R., 2007. Chemotherapy of schistosomiasis: present and future. *Current opinion in chemical biology* 11, 433-439.

Camargo, E.P., 2008. Doenças Tropicais. *Estudos avançados* 22(64), 95-110.

Chance, M.L., 1995. New developments in the chemotherapy of leishmaniasis. *Annals of tropical medicine and parasitology* 89, S37-43

Costa, P.V. Processo de obtenção e purificação de pilocarpina e seus sais. BR Pat. PI9203183, 1999-07-06. p.8.

Cupp-Vickery, J.R., Garcia, C., Hofacre, A., McGee-Estrada, K., 2001. Ketoconazole-induced Conformational Changes in the Active Site of Cytochrome P450. *Journal of molecular biology* 311, 101-110.

Davies, S.G., Roberts, P.M., Stephenson, P.T., Thomson, J.E., 2009. Syntheses of the racemic jaborandi alkaloids pilocarpine, isopilocarpine and pilosinine. *Tetrahedron letters* 50, 3509–3512.

Doenhoff, M., Cioli, D., Utzinger, J., 2008. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current opinion in infectious diseases* 21, 659-667.

Dunning, N., 2009. Leishmania vaccines: from leishmanization to the era of DNA technology. *Bioscience horizons* 2, 73-82.

Escaron, C.J., Lees, D.M., Tewari, R., Smith, D.F., Caron, E., 2007. A simple, robust and versatile method to characterise intracellular parasitism. *Molecular and biochemical parasitology* 153, 72-76.

Hadj-esfandiari, N., Navidpour, L., Shadnia, H., Amini, M., Samadi, N., Faramarzi, M.A. and Shafiee, A., 2007. Synthesis, antibacterial activity, and 16 quantitative structure–activity relationships of new (Z)-2-(nitroimidazolylmethylene)-3(2H)-benzofuranone derivatives. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 17, 6354–6363.

Kayser, O., Kiderlen, A.F., 2001. *In vitro* leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. *Phytotherapy research* 15, 148–152.

Kedzierski, L., Sakthianandeswaren, A., Curtis, J.M., Andrews, P.C., Junk, P.C., Kedzierska, K., 2009. Leishmaniasis: Current Treatment and Prospects for New Drugs and Vaccines. *Current medicinal chemistry* 16, 599-614(16).

Khabnadideh, S., Rezaei, Z., Khalafi-Nezhad, A., Bahrinajafi, R., Mohamadi, R, Farrokhrooz, A.A., 2003. Synthesis of N-Alkylated derivatives of imidazole as antibacterial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 13, 2863–2865.

Killick-Kendrick R., Rioux J.A. 1991. Intravectorial cycle of *Leishmania* in sandflies. *Annales de parasitologie humaine et comparee* 66(Suppl. 1), 71–74.

Kowalska-Pylka, A.H., Mayer-Dziedzic, B., Niewiadomy, A., Matysiak, J., 2001. Evaluation of substituted benzthioanilides toxicity using *in vitro* tests. *ATLA* 29, 547-556.

Lima, C.C., Criddle, D.N., Coelho-de-Souza, A.N., Monte, F.J., Jaffar, M., Leal-Cardoso, J.H., 2000. Relaxant and antispasmodic actions of methyleugenol on guinea-pig isolated ileum. *Planta medica* 66, 408-411.

Mallia, M.B., Subramanian, S., Banerjee, S., Sarma, H.D, Venkatesh, M., 2006. Evaluation of $^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3$ complex of 2-methyl-5-nitroimidazole as an agent for targeting tumor hypoxia. *Bioorganic & medicinal chemistry* 14, 7666–7670.

Melo, A.L., Barcellos, N.M.S., Demicheli, C., Frezard, F., 2003. Enhanced schistosomicidal efficacy of tartar emetic encapsulated in pegylated liposomes. *International journal of pharmaceutics* 255, 227–230.

Moraes, J., Silva, M.P.N., Ohlweiler, F.P., Kawano, T., 2009. *Schistosoma mansoni* and other larval trematodes in *Biomphalaria tenagophila* (Planorbidae) from Guarulhos, São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 51, 77-82.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods* 65, 55.

Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G., 2005. Advances in leishmaniasis. *The Journal-lancet* 366, 1561–77.

Olender D., Żwawiak, J., Lukianchuk, V., Lesyk, R., Kropacz, A., Fojutowski, A., Zaprutko, L., 2009. Synthesis of some N-substituted nitroimidazole derivatives as potential antioxidant and antifungal agents. *European journal of medicinal chemistry* 44, 645-652.

Ordóñez-Gutiérrez, L., Espada-Fernández, R., Dea-Ayuela, M. A., Torrado, J. J., Bolás-Fernandez, F., Alunda, J. M., 2007. In vitro effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *International journal of antimicrobial agents* 30, 325–329.

Rocha, L.G., Almeida, J.R.G.S., Macêdo, R.O., Barbosa-Filho, J.M., 2005. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine* 12, 514–535.

Sawaya, A.C.H.F., Abreu, I.N., Andreazza, N.L., Eberlin, M.N., Mazzafera P., 2008. HPLC-ESI MS/MS of Imidazole Alkaloids in *Pilocarpus microphyllus*. *Molecules* 13, 1518-1529.

Shuhua, X., Catto, B.A., 1989. In vitro and in vivo studies of the effect of artemether on *Schistosoma mansoni*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 33, 1557-1562.

Smithers, S.R., Terry, R.J., 1965. The infection of laboratory hosts with cercariae of *Schistosoma mansoni* and the recovery of the adult worms. *Parasitology* 55, 695–700.

Srinivas, N., Palne, S., Nishi, Gupta, S., Bhandari., 2009. Aryloxy cyclohexyl imidazoles: A novel class of antileishmanial agents. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 19, 324-327.

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

Venkatakrishnan, K., Moltke, L. L., Greenblatt, D. J., 2000. Effects of the antifungal agents on oxidative drug metabolism: clinical relevance. *Clinical pharmacokinetics* 38(2), 111-180.

Voigtlander, H.W., Balsam, G., Engelhardt, M., 1978. Epiisopiloturin, ein Neues Pilocapus-Alkaloid. *Archiv der Pharmazie* 311, 927-935.

Walczak K., Gondela A., Suwiński J., 2004. Synthesis and anti-tuberculosis activity of N-aryl-C-nitroazoles. *European journal of medicinal chemistry* 39, 849–853.

World Health Organization (WHO), 2009 . Neglected Tropical Diseases. Available at: http://www.who.int/neglected_diseases/en (accessed 29.10.2010).

Xiao, S.H., Keiser, J., Chollet, J., Utzinger, J., Dong, Y., Endriss, Y., Vennerstrom, J.L., Tanner, M., 2007. *In vitro* and *in vivo* activities of synthetic trioxolanes against major human schistosome species. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, 1440-1445.

Legends to Figures

Figure 1. (A) ESI+ MS spectra of epiisopiloturin showing the fragmentation from $[M+H]^+ = 287.04$ parent ion. (B) MS/MS the fragment ion $[M - H_2O + H]^+ = 269.04$. (C) MS3 the fragments ions are $[M - 2H_2O + H]^+ = 251.08$, $[M - H_2O - CH_2O_2 + H]^+ = 223.08$ and $M/z = 95.04$, this ion most probably corresponds to the positively charged (3-methylimidazole)methylene.

Figure 2. Effect of epiisopiloturin on amastigotes of *Leishmania amazonensis*. (A) Untreated infected macrophages, added with epiisopiloturin at (B) 2 $\mu\text{g/mL}$, (C) 16 $\mu\text{g/mL}$, and (D) 128 $\mu\text{g/mL}$. Results are expressed as Association Index (A.I.) = Percentage of infected macrophages x number of parasites per cell.

Figure 3. Effect of epiisopiloturin on macrophage peritoneal cells as measured by MTT assay. Each bar represents standard error of three independent experiments with similar results. The results analyzed by the Kruskal-Wallis test did not show differences between treatments ($p > 0.05$).

Figure 4. Effect of epiisopilotutin on the tegument of *Schistosoma mansoni*. After 120 hours of incubation with epiisopiloturin, adult male worms were fixed and fluorescent images were obtained using confocal microscopy. (A) Non-treated with epiisopiloturin (negative control). (C), (E), and (G), morphological structure on the *S. mansoni* induced by dose-dependent epiisopiloturin concentrations indicated on each inset. (B) Higher magnification of negative control. (D), (F), and (H) showed higher magnification on the $20.000 \mu\text{m}^2$ of surface area calculated with the Zeiss LSM Image Browser software.

Figure 5. The quantification of the number of tubercles was performed using confocal microscopy. Indicated are numbers of intact tubercles and these numbers were measured

in a 20,000 μm^2 of area calculated with the Zeiss LSM Image Browser software. A minimum of three tegument areas of each parasite were assessed. Values are means \pm SD (bars) of six male adult worms.

Table 1. *In vitro* effects of epiisopiloturin against 49-day-old adult *Schistosoma mansoni*

Group	N° of worms investigated	Incubation of period (h)	N° of dead worms	Motor activity reduction		N° of worms with tegumental alterations	
				Slight	Significant	Partial	Extensive
Control ^a	12	24	0	0	0	0	0
	12	48	0	0	0	0	0
	12	72	0	0	0	0	0
	12	96	0	0	0	0	0
	12	120	0	0	0	0	0
PZQ ^a	12	24	12	0	12	2	10
	12	48	12	0	12	2	10
	12	72	12	0	12	2	10
	12	96	12	0	12	2	10
	12	120	12	0	12	2	10
Epiisopiloturin 25 µg/mL	12	24	0	0	0	0	0
	12	48	0	0	0	0	0
	12	72	0	0	0	0	0
	12	96	0	0	0	0	0
	12	120	0	0	0	0	0
Epiisopiloturin 50 µg/mL	12	24	0	0	0	0	0
	12	48	0	0	0	0	0
	12	72	0	0	0	0	0
	12	96	0	0	0	0	0
	12	120	0	0	0	0	0
Epiisopiloturin 100 µg/mL	12	24	0	0	0	0	0
	12	48	0	0	0	0	0
	12	72	0	2	0	0	0
	12	96	0	4	2	0	0
	12	120	0	6	4	0	0
Epiisopiloturin 150 µg/mL	12	24	0	0	0	0	0
	12	48	0	4	2	0	0
	12	72	0	8	4	2	0
	12	96	0	2	10	3	1
	12	120	12	0	12	0	6
Epiisopiloturin 200 µg/mL	12	24	0	6	0	2	0
	12	48	0	6	6	3	0
	12	72	12	0	12	0	6
	12	96	12	0	12	0	6
	12	120	12	0	12	0	6

^a 2% DMSO.^b Tested at concentration of 3 µg/mL.

Figure 1

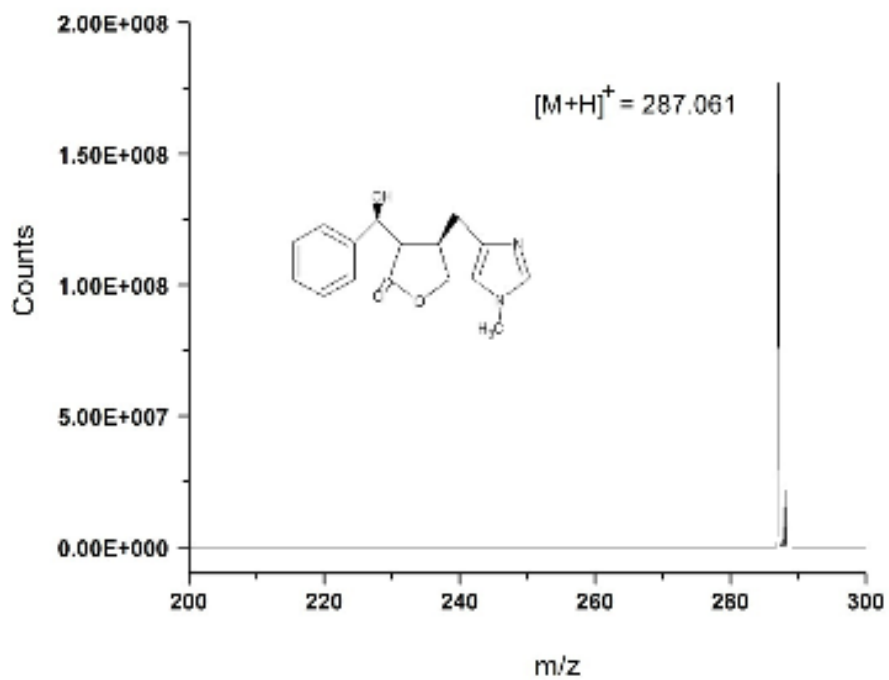


Figure 2.

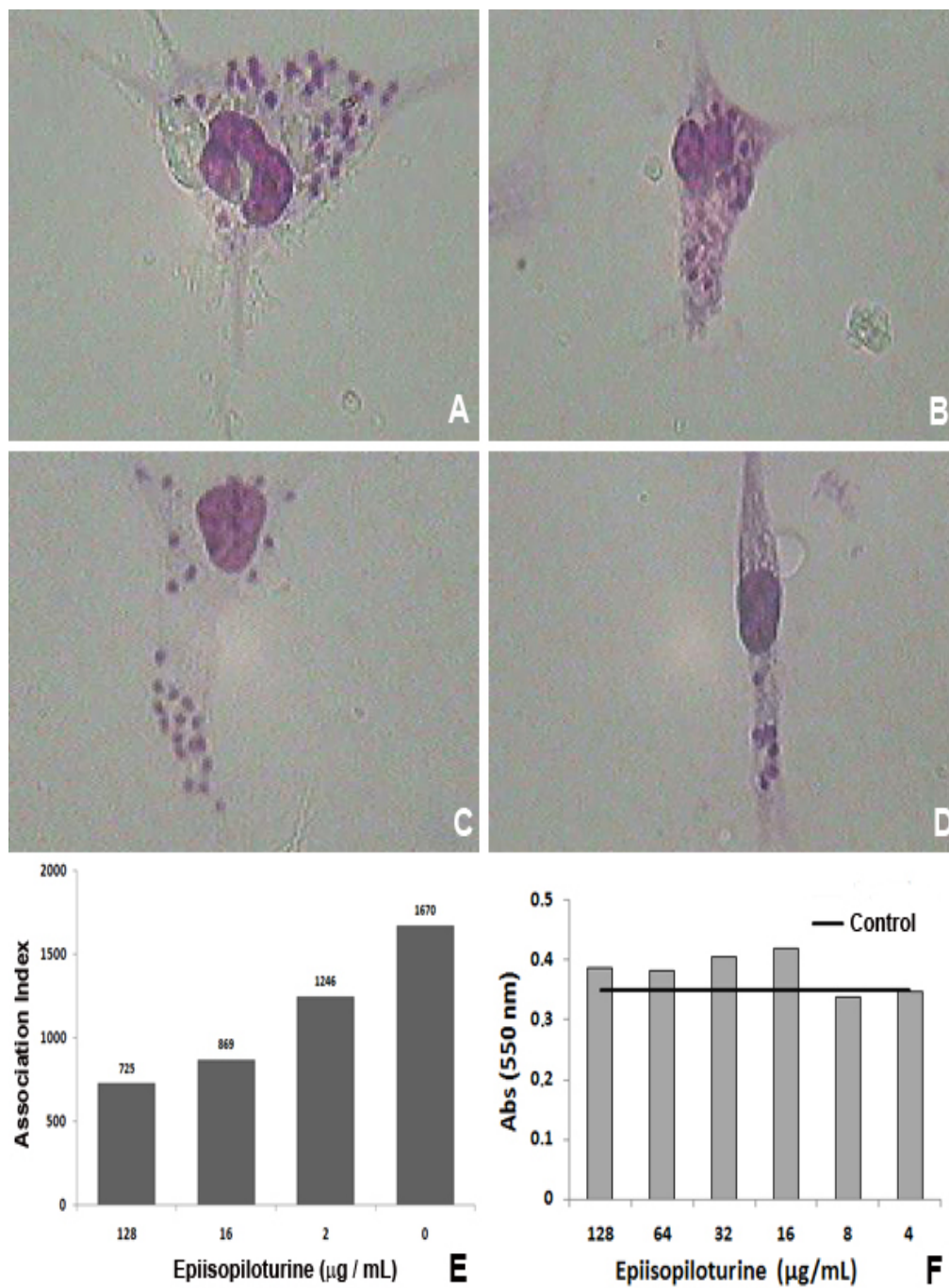


Figure 3.

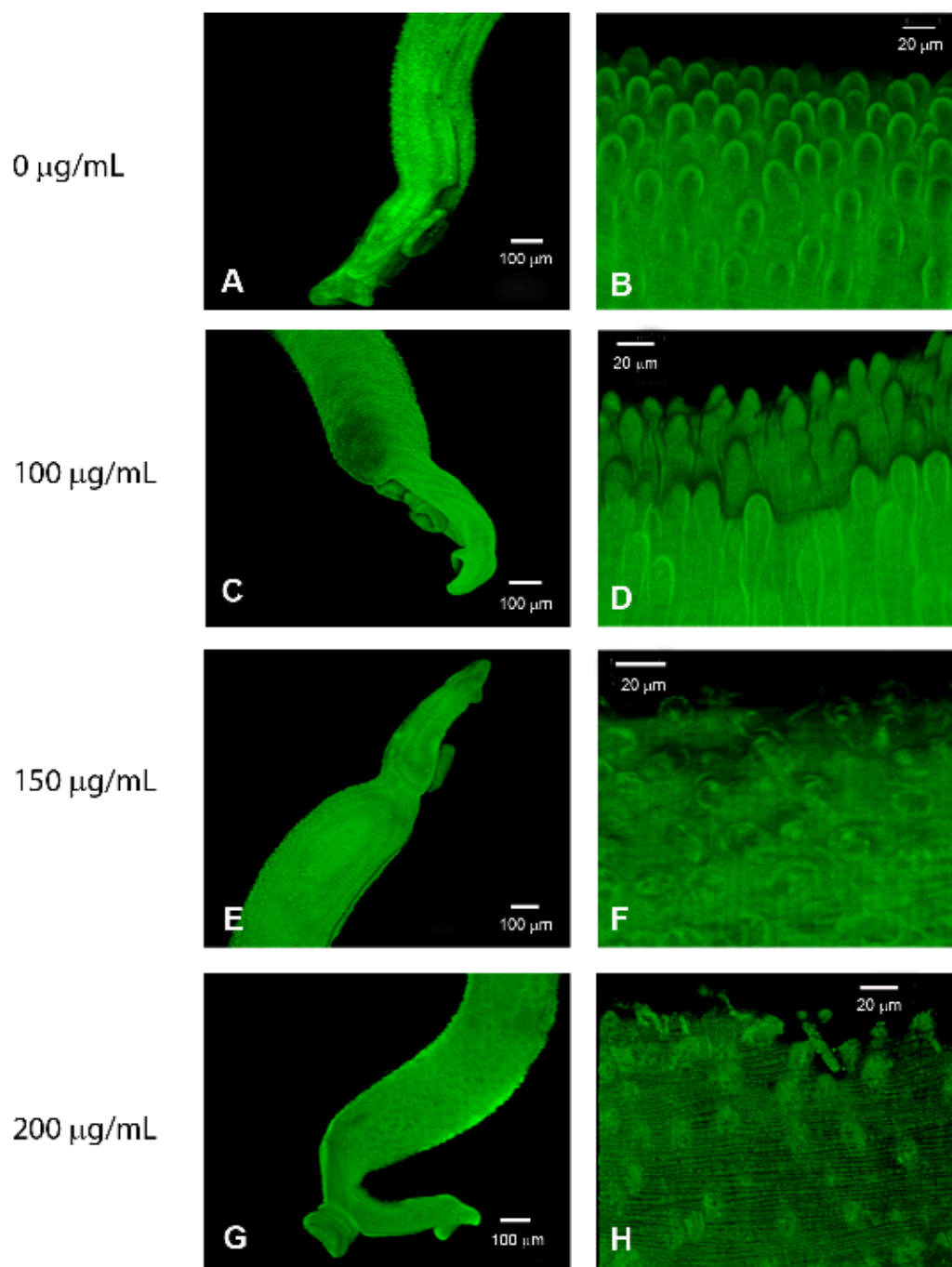


Figure 4.

