

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

Estabelecimento de uma plataforma de teste de compostos em
Schistosoma mansoni utilizando inibidores de fatores de
modificação epigenética

por
Naiara Cristina Clemente dos Santos Tavares de Paula

Belo Horizonte
2016

DISSERTAÇÃO MCS-CPqRR	N.C.C.S.T. PAULA	2016
-----------------------	------------------	------

Naiara Cristina Clemente dos Santos Tavares de Paula

Estabelecimento de uma plataforma de testes de droga em *Schistosoma mansoni* e sua validação utilizando inibidores de fatores de modificação epigenética

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Marina de Moraes Mourão

Belo Horizonte
2016

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do CPqRR
Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

P324e Paula, Naiara Cristina Clemente dos Santos Tavares
2016 de.

Estabelecimento de uma plataforma de teste de compostos em *Schistosoma mansoni* utilizando inibidores de fatores de modificação epigenética / Naiara Cristina Clemente dos Santos Tavares de Paula. – Belo Horizonte, 2016.

XVI, 113 f.: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 121 - 129

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Esquistossomose mansoni/quimioterapia 2. *Schistosoma mansoni*/enzimologia 3. Enzimas/uso terapêutico. I. Título. II. Mourão, Marina de Moraes (Orientação).

CDD – 22. ed. – 616.963

Naiara Cristina Clemente dos Santos Tavares de Paula

Estabelecimento de uma plataforma de testes de droga em *Schistosoma mansoni* e sua validação utilizando inibidores de fatores de modificação epigenética

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Banca Examinadora:

Dra. Marina de Moraes Mourão (CPqRR/FIOCRUZ) Presidente
Dr. Policarpo Ademar Sales Junior (CPqRR/FIOCRUZ) Titular
Dr. Ary Correa Junior (UFMG) Titular
Dra. Neusa Araujo Pereira (CPqRR/FIOCRUZ) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 29/02/2016

AGRADECIMENTOS

Ao longo desses dois anos de Mestrado, muitos amigos foram indispensáveis para que essa jornada fosse concluída. Muitos desafios foram presentes, porém, a todo o momento não faltou motivações, portanto, é com enorme prazer que escrevo esses agradecimentos.

A Dra Marina de Moraes Mourão que cumpriu excelentemente o seu papel de orientadora. Entretanto, ela não é uma orientadora como outra qualquer, e sim minha mentora desde a iniciação científica, que me apoiou quando meus planos de carreira poderiam ter sido mudados, que sempre me deu força para continuar na área da pesquisa. A Marina é a profissional em que me espelho e que me deixa orgulhosa em ser sua aluna.

A Sandra Grossi Gava, minha eterna coorientadora, pessoa que tem uma mente brilhante, que eu tenho certeza que vai me ajudar sempre quando for preciso, não importando o tamanho da ajuda. A Fernanda Sales Coelho, que também me auxilia desde a iniciação científica e quem me ajudou nos experimentos desse trabalho. A vocês meninas, meu eterno agradecimento por serem excelente colegas de trabalho e também amigas, que estavam sempre ao meu lado quando os momentos foram difíceis.

Ao Pedro Henrique Nascimento de Aguiar, que assim como a Fernanda, participou desse trabalho, fazendo possível sua conclusão.

Ao Juliano Michel de Araújo pela ajuda na transformação de cercarias e em diversos experimentos.

À Dra. Roberta Lima Caldeira e Dr. Omar dos Santos Carvalho que, assim como os integrantes do LHMM, acolheu a mim e aos alunos da Marina em seu grupo de pesquisa, nos fazendo sentir em casa.

A todos do LPCM, do GGBC e do LHMM que em algum momento fizeram parte da realização desse projeto e pelos momentos de descontração.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou pela estrutura disponibilizada.

Ao Moluscário do CPqRR e à Equipe do Biotério e Central de Esterilização por todo apoio.

A Ana Carolina Alves de Mattos, pela contribuição do estabelecimento do WormAssay.

Ao Márcio Sobreira Silva Araújo, e a todos do GIPB.

A Daniela Nabak Bueno Maia e a todos do QPNB.

Aos professores e funcionários da Pós Graduação em Ciências da Saúde do CPqRR.

Aos colaboradores do A-ParaDDise pela oportunidade.

À banca examinadora por ter aceitado o convite para avaliar e ajudar a finalizar esse trabalho

Às Agências Financiadoras e de apoio, CNPq, CAPES, FAPEMIG e Comissão Europeia.

Ao Augusto pela horas de dedicação para me ajudar na conclusão desse trabalho e pelo apoio incondicional à minha carreira.

A Alice pelos sorrisos, que foram indispensáveis para me manter focada no meu sonho.

Aos meus pais pelo apoio, admiração e pela preparação para a vida.

A todos os meus colegas, amigos e a toda minha família que sempre serão parte da minha história.

RESUMO

A esquistossomose é a segunda doença parasitária mais prevalente no mundo. Atualmente, seu tratamento depende de uma única droga, o Praziquantel; e devido a identificação de parasitos resistentes, o desenvolvimento de novas drogas é necessário. No Brasil, essa doença afeta cerca de 25 milhões de pessoas e não há uma plataforma de teste de novas drogas estabelecida. Com o intuito de estabelecer uma plataforma de testes de drogas anti-Schistosoma mansoni, foram padronizadas 3 metodologias para triagem de drogas em esquistossômulos, o ensaio de fluorescência utilizando alamarBlue®, a análise quantitativa de lactato e o ensaio visual por coloração com iodeto de propídio. A análise quantitativa de lactato e o ensaio visual por coloração com iodeto de propídio demonstraram ser mais sensíveis e confiáveis que o ensaio de fluorescência com alamarBlue® e foram escolhidos para a triagem de drogas em esquistossômulos. Para a triagem de drogas em vermes adultos foi utilizado o software para análise de movimento WormAssay. Compostos desenvolvidos para fatores de modificação epigenética por colaboradores do consórcio AParaDDisE foram utilizados para a validação da plataforma. Após a triagem de drogas em esquistossômulos, os compostos ativos foram selecionados para a determinação do IC50 e índice de seletividade. Nesse trabalho um total de 252 compostos foram testados e 132 foram ativos em S. mansoni, desse, 72 foram ativos em esquistossômulo e vermes adultos, 50 foram ativos somente em vermes adultos e 8 foram ativos somente em esquistossômulos. Dentre os compostos ativos foi possível determinar o índice de seletividade de 29 inibidores. Os compostos JQ1, MC3031, MC2141, MC2908, MC3668, MC2705, MC3073, C-646 e SPV-106 foram considerados potenciais drogas para o tratamento da esquistossomose, uma vez que foram ativos nas duas fases do parasito e exibem alto índice de seletividade. Esses resultados mostram que os fatores de modificações epigenéticas podem apresentar importante papel na viabilidade e sobrevivência do S. mansoni, confirmando o potencial dessas enzimas como alvo de drogas.

Palavras chave: Schistosoma mansoni, teste de drogas; modificação epigenética, enzimas modificadoras de histonas

ABSTRACT

Schistosomiasis is the second most prevalent parasitic disease in the world. Currently, the treatment of this disease rely on a single drug, Praziquantel; and due to the identification of resistant parasites, the development of new drugs is urged. In Brazil this disease affects around 25 million people and an anti-Schistosoma mansoni drug screening platform is inexistent. In order to solve this problem, 3 in vitro methodologies were standardized for schistosomula, the alamarBlue® fluorescence assay, lactate quantitative analysis and visual assay using propidium iodide staining. The lactate quantitative analysis and visual assay using propidium iodide staining proved to be more sensitive and reliable than the alamarBlue® fluorescence assay, thus were chosen for the schistosomula drug screening. For the drug screening in adult worms, the movement analysis software WormAssay was standardized and used. Compounds developed for epigenetic modification factors by collaborators of A-ParaDDisE consortium were tested for platform validation. After the drug screening in schistosomula, the active compounds were analyzed for its IC50 and selectivity index determination. In this work, a total of 252 compounds were tested and 132 compounds were active in *S. mansoni*, among those, 73 were active in schistosomula and adult worms, 50 were active in adult worms, only, and 8 were active in schistosomula only. Among the active compounds, it was possible to determine the selectivity index of 29 inhibitors. The compounds JQ1, MC3031, MC2141, MC2908, MC3668, MC2705, MC3073, C-646 e SPV-106 were considered potential drugs for schistosomiasis therapy considering that they were active in both Schistosoma stages and exhibited a high selectivity index and/or low IC50. The results showed that epigenetic modifications factors play an important role in parasite viability and survival, confirming the potential of these enzymes as drug targets.

Keywords: Schistosoma mansoni, drug screening, epigenetic modification, histone modifying enzymes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição global das espécies causadoras da esquistossomose	18
Figura 2 - Distribuição atual da esquistossomose no Brasil	19
Figura 3 - Ciclo de vida do <i>S. mansoni</i>	21
Figura 5 - Estratégia de tratamento do PCE.....	25
Figura 6 - Estrutura das histonas no nucleossomo.....	29
Figura 7 - Acetilação das histonas.....	31
Figura 8 - Metilação das histonas.....	33
Figura 9 - Esquistossômulos corados com Iodeto de propídio	47
Figura 10 - Análise do movimento de vermes adultos de <i>S. mansoni</i> pelo WormAssay	51
Figura 11 – Pipeline para teste de drogas em <i>S. mansoni</i>	59
Figura 12 – Diagrama de Venn dos compostos ativos nos ensaios de iodeto de propídio e lactato	83
Figura 13 – Diagrama de Venn dos compostos ativos nos ensaios de iodeto de propídio, lactato e WormAssay.....	111

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Padronização do ensaio de viabilidade com alamarBlue®.....	54
Gráfico 2 - Padronização do ensaio de viabilidade por análise quantitativa de lactato	57
Gráfico 3 - Viabilidade de esquistossômulos expostos a inibidores de PRMT1/LSD1 da série BS a 20 µM analisada por coloração com iodeto de propídio	60
Gráfico 4 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de SmHADAC8 da série TH a 10 µM analisada por coloração com iodeto de propídio.....	61
Gráfico 5 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de SmHADAC8 da série TH a 20 µM analisada por coloração com iodeto de propídio.....	62
Gráfico 6 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC e Sirtuínas a 10 µM analisada por coloração com iodeto de propídio...63	
Gráfico 7 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC e Sirtuínas a 20 µM analisada por coloração com iodeto de propídio...63	
Gráfico 8 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT da série MC a 10 µM analisada por coloração com iodeto de propídio.....	65
Gráfico 9 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT da série MC a 20 µM analisada por coloração com iodeto de propídio.....	66
Gráfico 10 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8 da série Kancera a 10 µM analisada por coloração com iodeto de propídio	68
Gráfico 11 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8 da série Kancera a 20 µM analisada por coloração com iodeto de propídio	69
Gráfico 12 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de PRMT1/LSD1 da série BS por análise quantitativa de lactato.....	71
Gráfico 13 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de SmHADAC8 da série TB e TH por análise quantitativa de lactato	73
Gráfico 14 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC e Sirtuínas (Dr. Manfred Jung) por análise quantitativa de lactato	75
Gráfico 15 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT as séries MC por análise quantitativa de lactato.....	76

Gráfico 16 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8 da série Kancera por análise quantitativa de lactato.....	78
Gráfico 17 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de PRMT1/LSD1 ativos em esquistossômulos da série BS	87
Gráfico 18 – Unidades de movimento de vermes adultos machos expostos aos inibidores de PRMT1/LSD1 inativos em esquistossômulos da série BS	89
Gráfico 19 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de PRMT1/LSD1 inativos em esquistossômulos da série BS	90
Gráfico 20 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de SmHDAC8 ativos em esquistossômulos da série TB e TH	91
Gráfico 21 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de SmHDAC8 inativos em esquistossômulos da série TB e TH	93
Gráfico 22 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de SmHDAC8 inativos em esquistossômulos da série TB	94
Gráfico 23 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC e Sirtuínas, ativos em esquistossômulos (Dr. Manfred Jung)	95
Gráfico 24 – Unidades de movimento de vermes adultos machos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT, ativos em esquistossômulos, da série MC.....	97
Gráfico 25 – Unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostas aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT, ativos em esquistossômulos, da série MC.....	99
Gráfico 26 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT, inativos em esquistossômulos, da série MC.....	102
Gráfico 27 – Unidades de movimento de vermes adultos machos expostos aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8, ativos em esquistossômulos, da série Kancera	104
Gráfico 28 – Unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostas aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8, ativos em esquistossômulos, da série Kancera	105
Gráfico 29 – Unidades de movimento de vermes adultos machos expostos aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8, inativos em esquistossômulos, da série Kancera	108
Gráfico 30 - Distribuição dos alvos para os quais os inibidores foram desenhados	113
Gráfico 31 - Distribuição dos alvos dos inibidores ativos de acordo com a fase e sexo do S. mansoni.....	114

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Compostos da série BS e utilizados na validação da plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni	Erro! Indicador não definido.	9
Quadro 2 - Compostos da série TB e utilizados na validação da plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni		40
Quadro 3 - Compostos da série TH desenvolvidos e utilizados na validação da plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni		40
Quadro 4 - Compostos desenvolvidos pelo Dr. Manfred Jung e utilizados na validação da plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni.....		41
Quadro 5 - Compostos da série MC desenvolvidos e utilizados na validação da plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni		41
Quadro 6 - Compostos desenvolvidos pela empresa Kancera e utilizados na validação da plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni.....		422

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – IC50, toxicidade em células de mamífero e índice de seletividade dos compostos ativos em esquistossômulos	80
Tabela 2 – Potenciais drogas anti-Schistosoma mansoni selecionadas.....	118

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BromoD: Bromodomínios
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DNMT: Metiltransferase de DNA
DOT1: Desestabilizador do silenciamento telomérico 1
EZH2: Enhancer of zeste homolog 2
HME: Enzima modificadora de histona
HAT: Histona acetiltransferase
HDAC: Histona deacetilase
HDACi: inibidor de histona deacetilase
HDAC8: Histona acetiltransferase 8
HKMT: Histona lisina metiltransferase
HDM: Histona demetilase
HMT: Histona metiltransferase
JMJ: Domínio jumonji
LSD1: Lisina demetilase 1
P300: Fator acetiltransferase
PARP: Poly (ADP-ribose) polymerase
PCAF: Fator associado a p300
PCE: Programa de controle da esquistossomose
PHDM: Pan histona demetilase
PRMT: Proteína arginina metiltransferase
PRMT1: Proteína arginina metiltransferase 1
PRMT6: Proteína arginina metiltransferase 6
RNA: Ácido ribonucléico
Sirt: Sirtuína
Sirt 1: Sirtuína 1
Sirt 2: Sirtuína 2
Sirt 6: Sirtuína 6
SmHDAC8: Histona deacetilase 8 de *S. mansoni*
SmSirt: Sirtuína de *S. mansoni*
WHO: Organização mundial da saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 A esquistossomose	17
1.2 Ciclo da esquistossomose mansônica	20
1.3 Patologia da esquistossomose mansônica	22
1.4 Tratamento e controle da esquistossomose mansônica	23
1.5 Testes de novas drogas em <i>S. mansoni</i>	25
1.6 Fatores de modificações epigenéticas como novos alvos de drogas anti- <i>Schistosoma mansoni</i>	28
2 JUSTIFICATIVA.....	35
3 OBJETIVOS.....	36
3.1 Objetivo geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 METODOLOGIA	37
4.1 Obtenção do material biológico.....	37
4.1.1 Transformação mecânica de cercárias em esquistossômulos.....	37
4.1.2 Obtenção de vermes adultos	38
4.2 Inibidores.....	38
4.2.1 Diluição dos inibidores de HMEs	44
4.3 Padronização de ensaios de viabilidade por método fluorimétrico em esquistossômulos in vitro.....	44
4.3.1 Ensaio de viabilidade - alamarBlue®.....	44
4.3.2 Ensaio de viabilidade por análise quantitativa de lactato.....	45
4.4 Ensaio de viabilidade visual utilizando iodeto de propídio.....	46
4.5 Determinação de 50% de inibição (IC50) em esquistossômulos	47
4.6 Ensaio de toxicidade em células de mamífero	48
4.7 Índice de seletividade	49
4.8 Ensaio de viabilidade de vermes adultos in vitro	49
4.9 Análises estatísticas.....	51
4.9.1 Ensaio de viabilidade alamarBlue®	51
4.9.2 Ensaio de viabilidade por análise quantitativa de lactato e ensaio visual com iodeto de propídio	51
4.9.3 Ensaio de viabilidade de vermes adultos.....	52
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	53

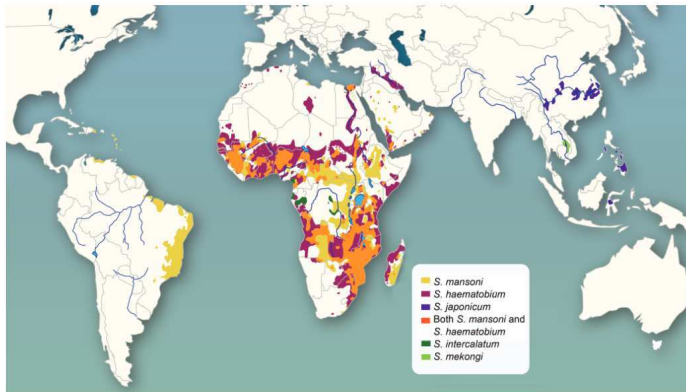
5.1 Padronização de ensaios de viabilidade por método fluorimétrico em esquistossômulos in vitro	53
5.1.1 Padronização do ensaio de viabilidade com alamarBlue®	53
5.1.2 Padronização de teste visual utilizando coloração com iodeto de propídio	55
5.1.3 Padronização do ensaio de viabilidade por análise quantitativa de lactato	56
5.2 Teste de inibidores de fatores de modificação epigenética	59
5.2.1 Teste de inibidores por análise de viabilidade visual por iodeto de propídio	59
5.2.2 Teste de inibidores por análise quantitativa de lactato	70
5.2.3 Determinação do IC50, toxicidade em células de mamífero e índice de seletividade	79
5.2.4 Comparação do ensaio visual por coloração com iodeto de propídio e análise quantitativa do lactato	82
5.2.5 Testes in vitro em vermes adultos	85
5.2.6 Comparação entre ensaio visual com iodeto de propídio, ensaio de lactato e WormAssay	110
5.3 Alvos e inibidores	112
6 CONCLUSÃO	119
7 PERSPECTIVAS	120
REFERÊNCIAS	121

1 INTRODUÇÃO

1.1 A esquistossomose

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por trematódeos do gênero *Schistosoma* Weiland, 1858 (PLATYHELMINTHES: TREMATODA) pertencente a ordem Digenea e família Schistosomatidae. É considerada incapacitante e insidiosa em idades precoces, registrando altos índices de morbidade e promovendo, portanto, grande impacto econômico (WEERAKOON et al, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO) (2002), a esquistossomose representa a principal doença em termos de morbidade e mortalidade entre as helmintoses e causa perdas anuais de até 4,5 milhões em DALY (“Disability Adjusted to Life Year”). A WHO estima que aproximadamente 248 milhões de pessoas estão acometidas por essa doença em 78 países e que 800 milhões de pessoas vivam em áreas de risco (WHO, 2015). A esquistossomose é endêmica nas Américas, África e Ásia (Figura 1) causando, por ano, a mortalidade de cerca de 200 mil pessoas (WHO, 2011). As principais espécies causadoras da doença no homem são *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907, *Schistosoma japonicum* Katsurada, 1904, *Schistosoma haematobium* (Bilharz, 1852) Weiland, 1858, *Schistosoma intercalatum* Fisher, 1934 e *Schistosoma mekongi* Voeg, Bruckner & Bruce, 1978 (ROKNI, 2012).

Figura 1- Distribuição global das espécies causadoras da esquistossomose



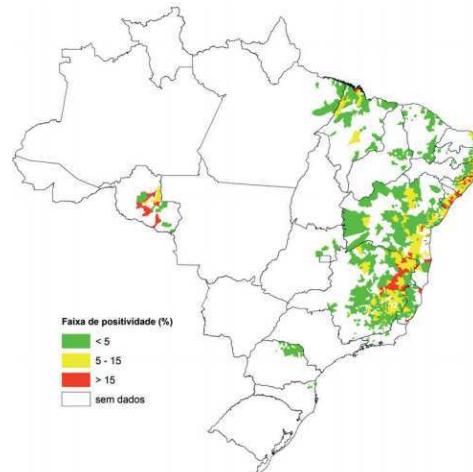
As espécies causadoras da esquistossomose estão distribuídas nas Américas, África e Ásia. A espécie *S. mansoni* é endêmica na América do Sul e África, *S. haematobium* na África, *S. japonicum* e *S. mekongi* na Ásia e a espécie *S. intercalatum* somente na África. Alguns países da África apresentam registros da ocorrência de *S. mansoni* e *S. haematobium*. Fonte: WEERAKOON et al, 2015.

O *S. haematobium* está presente em 53 países, principalmente na África, Oeste do Mediterrâneo e Índia e causa a esquistossomose hematóbica ou urinária, devido aos sintomas urinários. A espécie *S. mansoni* é prevalente em 54 países, ocorrendo principalmente na África, América Latina e Antilhas e a infecção causada por esta espécie é denominada esquistossomose mansônica ou intestinal devido à localização dos parasitos e sintomas predominantemente intestinais. O *S. japonicum* também é responsável pela esquistossomose intestinal, sendo encontrado em países da Ásia (PARISE FILHO; SILVEIRA, 2001). O *S. intercalatum* e *S. mekongi* são encontrados na África e Ásia, respectivamente, e suas manifestações clínicas são parecidas com a doença causada por *S. mansoni* e *S. japonicum* (JOURDANE et al, 2001; OHMAE et al, 2004)

No Brasil, a espécie causadora é o *S. mansoni* e sua introdução ocorreu no século XVI com a inserção de populações africanas na região Nordeste. As condições ecológicas e a presença de planorbídeos hospedeiros intermediários do parasito determinaram a instalação e a transmissão da esquistossomose, e, a partir da migração interna que ocorreu no país, iniciou-se a dispersão da doença para novas áreas (SILVEIRA, 1989).

Atualmente, 19 Unidades Federativas do Brasil apresentam transmissão da esquistossomose (Figura 2), sendo endêmica no Ceará, Piauí e Maranhão na região Nordeste, no Norte nos estados do Pará e Roraima, na região Centro-Oeste em Goiás e Distrito Federal, no Sudeste nos estados de Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais e na região Sul, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (BRASIL, 2014). De acordo com a WHO (2011), estima-se que cerca de 25 milhões de pessoas vivam em áreas endêmicas no Brasil e 6 milhões de pessoas estejam infectadas (KATZ; ALMEIDA, 2003).

Figura 2 - Distribuição atual da esquistossomose no Brasil



Segundo inquéritos coprocópicos realizados até 2012 a esquistossomose é encontrada na região Nordeste, no Norte, na região Centro-Oeste, no Sudeste nos estados de Espírito Santo, na região Sul. A maior porcentagem de positividade, acima de 15%, é encontrada em municípios dos estados de Roraima, Maranhão, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo. Fonte: BRASIL, 2014.

No ano de 2012, 589.906 pessoas foram examinadas e 4,5% apresentaram positividade para a doença. Ainda neste ano, em 100 mil habitantes, foram registrados 426 óbitos por esquistossomose (BRASIL, 2014).

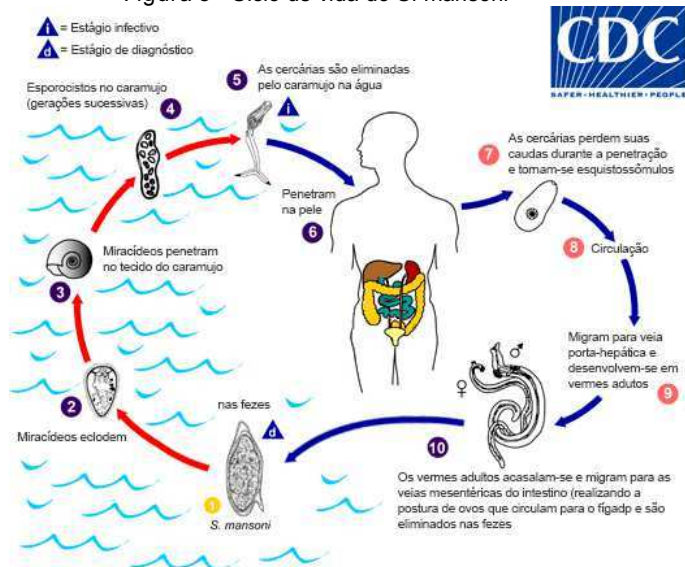
1.2 Ciclo da esquistossomose mansônica

O *S. mansoni* tem o homem como principal reservatório, mas também é capaz de infectar roedores e primatas (GRYSEELS et al, 2006). O ciclo de vida do *Schistosoma* (Figura 4) é bastante complexo, passando por seis fases (cercária, esquistossômulo, verme adulto, ovo, miracídio e esporocisto). Os parasitos alternam por fases de vida livre, em que habitam ambientes aquáticos, alternando com fases em que vivem no hospedeiro definitivo mamífero, onde se desenvolve na fase adulta sexuada, e o hospedeiro intermediário, onde se desenvolve em fase assexuada (KATZ; ALMEIDA, 2003). No caso de *S. mansoni*, os hospedeiros intermediários são caramujos pertencentes à família Planorbidae do gênero *Biomphalaria*. No Brasil, as espécies *B. glabrata* Say, 1818, *B. stramineae* Dunker, 1848 e *B. tenagophila* Orbigny, 1835 estão envolvidas na disseminação da esquistossomose (CARVALHO, et al, 2008). Segundo Lambertucci e colaboradores (1987), a espécie *B. glabrata* pode ser considerada como a mais importante, devido à sua eficiência na transmissão do parasito e a amplitude de sua distribuição.

O ciclo de transmissão da esquistossomose se dá quando fêmeas de *S. mansoni* viventes no hospedeiro definitivo realizam a postura dos ovos, os quais são eliminados junto com as fezes do hospedeiro definitivo, promovendo assim a contaminação das coleções hídricas. Quando ocorre o contato dos ovos com a água e estimulação por fatores tais como: alta temperatura, luz intensa e oxigenação da água, os miracídios, que são larvas ciliadas de vida livre, eclodem (MELO, 2011). Ao entrar em contato com o tegumento do caramujo, o miracídio penetra no mesmo através de agitação intensa e ação enzimática. Com isso, o miracídio perde parte de suas estruturas e, em 48 horas, origina a fase de esporocisto, caracterizado como um saco alongado preenchido de células germinativas. Esses esporocistos são denominados primários e, na segunda semana de infecção, se tornam esporocistos secundários, quando se inicia a formação das cercárias. As cercárias são larvas com corpo e cauda e são de vida livre, migram para as partes moles externas do caramujo e são eliminadas para o meio externo (KATZ; ALMEIDA, 2003). Ao serem liberadas, as cercárias nadam livremente, podendo sobreviver por até 48 horas. Quando encontram o hospedeiro definitivo, geralmente o homem, as cercárias iniciam a penetração através de ação mecânica e liberação de enzimas proteolíticas. Assim que a penetração é efetivada, ocorre a perda da cauda e o parasito se

diferencia em esquistossômulo. Os esquistossômulos iniciam então a migração para os pulmões. Ao alcançarem os pulmões, caem na corrente sanguínea e vão se alojar primariamente no sistema porta intra-hepático, onde, cerca de 25 dias após a penetração, se desenvolvem em vermes adultos. Ao final do desenvolvimento, machos e fêmeas migram para os vasos mesentéricos inferiores do hospedeiro definitivo, onde iniciam o acasalamento e a ovoposição após o 35º dia de infecção. As fêmeas liberam entre 100 e 1000 ovos por dia. Estes ovos, por sua vez, migram através das paredes dos vasos em que foram depositados, atingindo os tecidos, alojando-se no fígado e podendo atingir o lúmen intestinal. Cerca de 42 dias após a infecção, os ovos já podem ser encontrados nas fezes do hospedeiro vertebrado (NEVES, 2005).

Figura 3 - Ciclo de vida do *S. mansoni*



No ciclo do *S. mansoni* os ovos são eliminados nas fezes (1). Em condições ótimas os miracídeos eclodem (2) e penetram em caramujos do gênero *Biomphalaria* (3). No caramujo o parasito se desenvolve em esporocistos, 2 estágios (4), e posteriormente em cercárias que são eliminadas na água (5). As cercárias nadam e penetram no hospedeiro vertebrado, geralmente o homem (6), nesse momento elas perdem suas caudas e se desenvolvem em esquistossômulos (7). Os esquistossômulos migram através de vários tecidos (8) e se desenvolvem em vermes adultos no sistema porta-hepático (9). Os vermes acasalados migram para o intestino e realizam a postura de ovos (10). Fonte: Adaptado de <http://www.cdc.gov/parasites/schistosomiasis/biology.html>

1.3 Patologia da esquistossomose mansônica

A patologia da esquistossomose é dividida em fases aguda e crônica. Na forma aguda, a maioria dos portadores são assintomáticos, mas na forma sintomática a primeira manifestação clínica do indivíduo infectado é o processo imunoinflamatório caracterizado por dermatite com erupções maculopapular causada pela penetração da cercária na pele (KOLAROVÁ et al, 2013). Em alguns indivíduos é possível ocorrer a chamada febre de Katayama após 3 a 4 semanas de infecção. Esse quando é caracterizado por sintomas como linfadenopatia, febre, eosinofilia, sudorese, dores musculares, dor no fígado ou no intestino, diarreia e prostração (BRASIL, 2014). Segundo Neves e Raso (1965), em alguns casos a forma aguda pode evoluir rapidamente para a forma hepatoesplênica.

A fase crônica da doença pode apresentar diferentes formas, sendo que 90% dos pacientes exibem a forma leve e 4% a 10% exibem formas graves a avançadas. Na forma leve os indivíduos infectados são assintomáticos e ocasionalmente relatam algumas manifestações clínicas (CARVALHO et al, 2008).

A forma grave apresenta fibrose hepática periportal e a forma hepática avançada é caracterizada por fígado hepatoesplênico. A forma considerada como mais grave, a hepatoesplênica, hoje é raramente encontrada, e é caracterizada pela presença da fibrose portal e hipertensão portal que levam à esplenomegalia (CARVALHO et al, 2008). A fibrose portal é causada pela formação de granulomas devido a deposição de ovos e posterior reação inflamatória granulomatosa, acarretando a destruição vascular e fibrose (NEVES, 2005). Em casos muito raros, os vermes e ovos podem se alojar em tecidos diversos, causando as formas ectópicas da doença (CARVALHO et al, 2008).

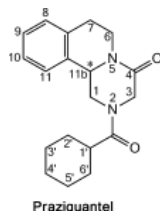
A esquistossomose, mesmo não sendo encontrada majoritariamente em suas formas mais graves, está associada com condições debilitantes generalizadas como subnutrição, anemia, retardo no crescimento e debilitação do crescimento na infância, o que acarreta problemas socioeconômicos (KING; DANGERFIELD-CHA, 2008).

1.4 Tratamento e controle da esquistossomose mansônica

Para que haja diminuição da doença é necessário o controle da transmissão do parasito, evitando reinfecções (GRYSEELS et al, 2006). O controle da esquistossomose tem como principais objetivos reduzir a morbidade e diminuir a transmissão da doença através de intervenções na transmissão (WHO, 2015). Essas medidas podem atuar sobre o parasito, hospedeiro intermediário e frequência ou chance de contato do homem com a doença (SILVEIRA, 1989).

O controle dos portadores é feito através do tratamento para reduzir a carga parasitária e impedir o aparecimento de formas graves (BRASIL, 2010). O tratamento da esquistossomose para pacientes sem lesões avançadas consiste na utilização de medicamentos específicos, sendo o Praziquantel® (PZQ) (Figura 4) o medicamento disponível para crianças e adultos e utilizado pelo Programa de Controle da Esquistossomose (PCE). O PZQ é um derivado pirazino-isoquinoleínico pertencente ao grupo dos tioxantônicos. Sua administração é realizada por via oral, em dose única de 50 mg/kg de peso para adultos e de 60 mg/kg de peso para crianças, sendo o índice de cura de aproximadamente 80% e 70%, respectivamente (BRASIL, 2014). Vermes expostos a essa droga apresentam um massivo influxo de cálcio, contração da musculatura e ruptura no tegumento (FETTERER et al, 1980; BECKER et al, 1980; DOENHOFF; FALLON, 1994). A eficácia do PZQ é dependente do tempo de infecção, do sexo dos vermes e do seu estado de acasalamento. Durante os estágios iniciais o parasito é suscetível, seguido por progressiva insensibilidade após 3 a 4 semanas (THÉTIOT-LAURENT et al, 2013).

Figura 4 - Estrutura do Praziquantel



Fonte: THÉTIOT-LAURENT et al, 2013

O Praziquantel é de baixo custo, baixa toxicidade e seus efeitos colaterais são relativamente leves e transitórios. Porém, este fármaco também apresenta algumas limitações, como pouco ou nenhum efeito sobre ovos e vermes imaturos de *S. mansoni*. Além disso, a ocorrência de cepas do parasito resistentes a este fármaco já foi relatada por vários investigadores como resultado de experimentação laboratorial ou em campo (BRUCE et al, 1987; GREENBERG, 2013).

Por sua vez, a Oxamniquina (OXA), droga que anteriormente era usada pelo PCE, é eficaz apenas contra *S. mansoni* e ineficaz contra as outras duas principais espécies (*S. haematobium* e *S. japonicum*). O uso de OXA tem sido, até agora, quase totalmente restrito ao Brasil e outros países sul-americanos. (DOENHOFF et al, 2008). Além disso, segundo Cunha e Pedrosa (1986) a OXA apresenta atividade transitória, reduz o número de vermes, mas não suprime a parasitose. Atualmente, esse medicamento não é mais produzido, portanto, o Praziquantel é a única droga disponível para o tratamento da esquistossomose.

Engels e colaboradores (2002) e a WHO (2011) afirmam que é necessário a procura de uma nova droga esquistossomicida, de preferência ativa em todas as fases do parasito.

A contaminação dos ambientes aquáticos dulcícolas com fezes contendo ovos de *S. mansoni* é o principal fator de transmissão da esquistossomose, sendo necessárias intervenções para impedir o contato dos ovos com o meio ambiente (CARVALHO et al, 2008). O saneamento ambiental, portanto, cria condições que reduzem a proliferação e a contaminação dos hospedeiros intermediários, com consequente interrupção do ciclo evolutivo do parasito e a diminuição da exposição do hospedeiro à forma infectante, reduzindo assim o número de casos (GRYSEELS et al, 2006).

O uso de moluscidas como alternativa para o controle da esquistossomose foi amplamente utilizado na década de 70. Essa prática reduziu temporariamente a população de caramujos e, conseqüentemente, induziu a mortalidade de miracídios e cercárias, porém, com o passar do tempo, as populações de caramujos se recompuseram rapidamente e outros animais, como peixes e anfíbios, foram amplamente afetados pelos moluscidas (CARVALHO et al, 2008).

Atualmente, no Brasil, a estratégia para controle da esquistossomose é a identificação de indivíduos portadores da doença e posterior tratamento seletivo. A

estratégia de tratamento se baseia na porcentagem de positividade em exames coprocópicos, como representado na figura 5 (Brasil, 2014).

Figura 5 - Estratégia de tratamento do PCE

Percentual de positividade	Estratégia de tratamento
Menor que 15%	Tratar somente os indivíduos com exame parasitológico de fezes positivo
Entre 15% e 25%	Tratar os indivíduos com exame parasitológico de fezes positivo e os conviventes
Maior que 25%	Tratar todos os indivíduos da localidade (coletivo)

Fonte: Brasil, 2014

Essa estratégia utilizada pelo Ministério da Saúde foi fundamentada segundo diretrizes da WHO e tem como objetivo "evitar a ocorrência de formas graves e óbitos, reduzir a prevalência da infecção e impedir a expansão geográfica da endemia (CARVALHO et al, 2008).

1.5 Testes de novas drogas em *S. mansoni*

Várias abordagens são utilizadas na busca de um novo fármaco para auxiliar o combate a esquistossomose. Dentre elas podemos destacar:

- a abordagem que consiste em triar numerosas drogas que não foram selecionadas anteriormente,
- a abordagem em que somente são triadas drogas que em algum ensaio prévio demonstrou efetividade no *S. mansoni*;
- a abordagem em que são testadas drogas capazes de alterar o metabolismo do parasito;
- a abordagem que consiste em rastrear novos alvos de drogas a partir da análise do genoma do parasito (CARVALHO et al, 2008).

A triagem de drogas pode ser realizada *in vitro* e *in vivo*, uma vez que a atividade da droga sobre o parasito pode ter padrões diferentes. Para os testes *in vivo* é sugerido a utilização do camundongo como animal de escolha e os padrões que devem ser observados após o tratamento dos animais infectados com as drogas a serem testadas são a contagem de ovos no fígado e/ou intestino, contagem de

granulomas no fígado, alterações no oograma e contagem de número de vermes recuperados por perfusão (PELLEGRINO; KATZ, 1968). Katz e colaboradores (2013) realizaram testes in vivo com o fármaco Glivec® nos quais camundongos infectados foram submetidos ao tratamento em dose única com esse fármaco após 45 dias de infecção, após 15 dias do tratamento os animais foram submetidos à eutanásia e não foram encontrados vermes adultos mortos e nenhuma alteração no oograma. Adicionalmente, nos testes in vitro realizados com o Glivec®, os pesquisadores observaram diminuição no movimento e alterações morfológicas nos vermes adultos e ausência de ovos.

Para os testes in vitro, várias técnicas são descritas, sendo a observação de mortalidade de vermes adultos e esquistossômulos em microscópio a mais comumente usada (ABDULLA et al, 2009; RINALDI et al, 2015) e tida como padrão ouro para análise de viabilidade. Várias técnicas de triagem de drogas em helmintos foram criadas recentemente, como o monitoramento do desenvolvimento e movimento do parasito por vídeo, por impedância, métodos enzimáticos, colorimétricos, fluorimétricos, entre outros (HOWE, 2015; MARCELLINO, 2012; PAVELEY et al, 2012; SMOUT et al, 2010; TRITTEN et al, 2012; MANSOUR; BICKLE, 2010; PEAK et al, 2010.).

Um exemplo de método fluorimétrico é a quantificação de lactato. Esquistossômulos transportam glicose presente no sangue do hospedeiro através do tegumento por transportadores de glicose denominados SGTP1 e SGTP4 (KRAUTZ-PETERSON et al, 2010). O lactato é o produto final obtido através da quebra da glicose durante a glicólise e é excretado através do SmAQP, um homólogo da aquagliceoporina, que está localizada no tegumento do parasito (FAGHIRI et al, 2010). A quantidade de lactato excretada pelo parasito pode ser quantificada por ensaios fluorimétricos a partir de sondas que se ligam ao lactato e emitem fluorescência que é captada por leitores de fluorescência. Esse método foi utilizado por HOWE e colaboradores (2015) em *S. mansoni* e foi relatada a sua sensibilidade desse ensaio para medir a viabilidade de esquistossômulos e vermes adultos.

Peak e colaboradores (2010) compararam o uso do iodeto de propídio e o marcador diacetato de fluoresceína (FDA) para análise de viabilidade de esquistossômulos. O iodeto se intercala no DNA caso a membrana celular esteja permeável. No entanto, em esquistossômulos viáveis o iodeto de propídio é incapaz de atravessar a membrana, ao contrário de parasitos mortos, em que a

permeabilidade da membrana está violada, permitindo que esse reagente core os ácidos nucleicos. Além disso, o uso desse marcador vem sendo utilizado pelo nosso grupo ao longo dos anos, como descrito por Mourão e colaboradores (2009) em que foram realizados ensaios de estresse oxidativo em esporocistos. Ainda, foi descrito que o FDA, um substrato de esterase, que ao contrário do iodeto de propídio, é capaz de penetrar na membrana do esquistossômulo vivo. Devido a atividade esterase do parasito, o FDA não é liberado para o meio externo. Nos ensaios com marcadores fluorescentes, para analisar a presença ou ausência de coloração, é necessário visualizar os parasitos em microscópio invertido de fluorescência.

A utilização do reagente alamarBlue® vem sendo amplamente utilizado em testes de drogas em espécies de *Trypanosoma*, Gruby 1843 e *Leishmania*, Ross, 1903 (BOWLING, 2012; SHIMONY; JAFFE, 2008). Este método se baseia na reação de oxidação-redução (Redox), em que, o corante azul, resazurina, sofre uma mudança colorimétrica em resposta à redução metabólica celular. A forma reduzida é identificada com a cor rosa, assim, a intensidade da fluorescência produzida é proporcional ao número de células vivas. Em testes de drogas em *S. mansoni*, esse ensaio se mostrou efetivo na detecção da maioria das drogas testadas, demonstrando que as mesmas foram capazes de afetar a viabilidade esquistossômulos, porém, os autores relatam que seu uso é controverso (MANSOUR; BICKLE, 2010).

Ensaio baseado na avaliação da presença ou ausência de motilidade dos vermes são amplamente utilizados para triagem de drogas anti-helmínticas. Kotze e colaboradores (2004) realizaram testes visuais de sensibilidade a droga em espécies de *Strongyloides*. Esse método consistiu na contagem das larvas que exibissem motilidade após 48 horas de incubação com a droga e após estimulação com água quente. Esse método demonstrou ser um ensaio eficiente para teste de novas drogas e detecção de resistência, mas, no entanto, bastante subjetivo.

A análise do movimento da fase larval do *S. mansoni* é pouco usada. Entretanto, Paveley e colaboradores (2012) descreveram o uso de imagens para analisar esse fenótipo em parasitos expostos a drogas. Esse método se baseia em coletar imagens em time-lapse a cada 6 segundos. Para a análise era calculada a mudança acumulativa na área ocupada por cada esquistossômulo entre cada foto. Os pesquisadores concluíram que esse método é adequado para triagem de drogas

em esquistossômulos, entretanto demanda uma análise complexa com treinamento de máquina.

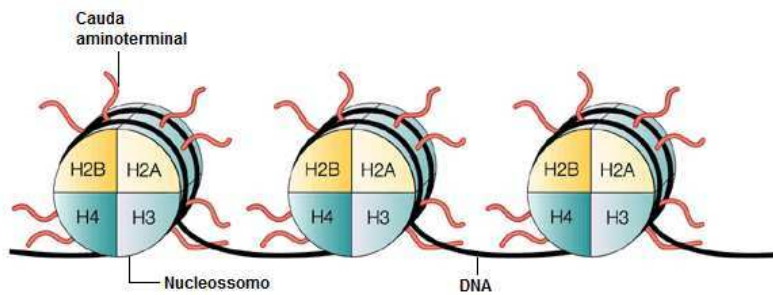
Recentemente, Rinaldi e colaboradores (2015) adaptaram a metodologia que se baseia em impedância, chamada de *xCELLigence*, para avaliar a motilidade de ovos, cercárias, esquistossômulos e vermes adultos de *S. mansoni*. Esse ensaio consiste em analisar a mudança na condutividade devido ao contato do parasito com os eletrodos; portanto, quanto maior o movimento, maior a mudança observada. Verificou-se a possibilidade da utilização desse método em testes de drogas em cercárias, ovos e vermes adultos. No entanto, este método se encontra em estágio preliminar de padronização, uma vez que apenas 1 droga foi testada e há grande variação entre frequências.

Um ensaio de viabilidade *in vitro* de alto rendimento e que fornece medidas quantitativas do movimento de vermes helmintos foi desenvolvido por Marcellino e colaboradores (2012). O método demonstrou ser eficiente e sensível para teste de drogas em vermes adultos de *S. mansoni*, já que o movimento é considerado um fenótipo de muita importância para ensaios de alto desempenho. Para esse ensaio são necessários uma câmera de vídeo e o programa disponibilizado gratuitamente denominado *WormAssay*, que fornece unidades de movimento de verme adulto em placas de cultura. Quanto menor o valor de unidades de movimento gerado pelo programa, menor a viabilidade do parasita

1.6 Fatores de modificações epigenéticas como novos alvos de drogas anti-*Schistosoma mansoni*

Histonas e proteínas não-histonas, associadas aos cromossomos, são proteínas que se ligam ao DNA formando o complexo denominado cromatina (ALBERTS, 2010). A cromatina apresenta uma subunidade fundamental, o nucleossomo. Cada partícula do nucleossomo é composta de um octâmero de quatro histonas, composto por duas unidades das histonas H2A, H2B, H3 e H4 e o DNA dupla fita com 147 nucleotídeos (Figura 6). O octâmero de histonas forma um cerne proteico com carga positiva ao qual o DNA se enrola, compactando-o (RUIJTER et al, 2003).

Figura 6 - Estrutura das histonas no nucleossomo



Fonte: Modificado de MARKS et al. 2001

Cada histona é composta por 102 a 135 aminoácidos, um motivo estrutural comum chamado dobra de histonas (compostas por três α -hélices ligadas por alças) e uma cauda aminoterminais flexível que se projeta para fora do complexo histona-DNA. Essas caudas podem sofrer, através da ação de enzimas, várias alterações covalentes pós-traducionais, tais como acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação de resíduos específicos de aminoácidos. A grande diversidade de modificações, que inclui um número elevado de resíduos modificados nas caudas das histonas, permite combinações específicas que afetam a estrutura global da cromatina e a transcrição de genes, o chamado "código de histonas" (ALBERTS, 2010; JASENCAKOVA et al, 2003).

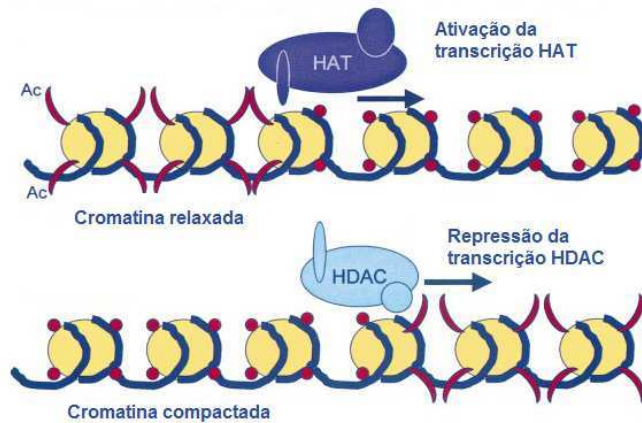
As alterações sofridas pelas histonas são epigenéticas e geram mudanças observadas na expressão de genes que não podem ser identificadas por alterações na sequência do DNA (BIRD, 2007). As alterações epigenéticas são reversíveis e apresentam grande relevância por terem papel central na regulação da cromatina e expressão gênica, incentivando o estudo das enzimas modificadoras de histonas (HMEs) como alvo de terapia (MENDITI, KANG, 2007).

A acetilação de resíduos de lisina e a metilação de lisinas e/ou argininas das caudas de histonas H3 e H4 são duas alterações que parecem ser particularmente importantes por afetarem a estrutura da cromatina e, conseqüentemente, a regulação da transcrição (BERGER, 2002; KOUZARIDES, 2007). As enzimas modificadoras de histonas envolvidas na inserção e remoção de grupos acetil são

denominadas histonas acetiltransferases (HAT) e histonas deacetilases (HDAC). As enzimas envolvidas na inserção e remoção de grupos metil são chamadas histonas metiltransferases (HMT) e histonas demetilases (HDM) (DE LA CRUZ et al, 2005).

A inserção de grupos acetil (Figura 7) e metil (Figura 8) neutraliza as cargas positivas das histonas, desestabilizando a estrutura do nucleossomo e permitindo que o DNA se separe das histonas. Dessa forma, o acesso de fatores de transcrição e da RNA polimerase ao DNA é facilitado, ativando, assim, a expressão gênica. Já a retirada desses grupos tem efeito oposto, reforça as cargas positivas e faz com que a cromatina se condense ainda mais, reprimindo assim a transcrição (CAVALCANTE; BRUIN, 2009). A heterocromatina se encontra transcricionalmente inativa quando, altamente metilada na lisina 9 da histona H3, hipometilada na lisina 4 da H3, hipoacetilada nas histonas H3 e H4 e existe uma certa conservação deste código entre organismos (JASENCAKOVA et al, 2003).

Figura 7 - Acetilação das histonas



A adição de acetil pela HAT relaxa a cromatina, ativando a transcrição, já a retirada desse grupo, realizada por HDAC compacta a cromatina e reprime a transcrição. Fonte: Adaptado de RUIJTER et al, 2003

Uma das abordagens mais promissoras para drogas que modulam processos epigenéticos consiste no desenvolvimento de inibidores de histona deacetilases (HDACs). As HDACs são enzimas muito estudadas como alvo para drogas relacionadas ao câncer e doenças parasitárias causadas por *Trypanosoma brucei*, *Plasmodium falciparum*, e *Leishmania spp*, entre outras (OUAISSI; OUAISSI, 2006; NEW et al, 2012).

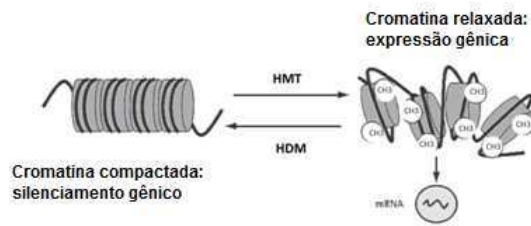
Ao longo dos anos, têm sido desenvolvidos muitos tipos diferentes de inibidores de HDAC (HDACi). Os inibidores de HDACs de classe I e II são classificados em quatro famílias de acordo com suas estruturas: inibidores pertencentes ao grupo dos ácidos graxos de cadeia curta (o Butirato e Ácido Valpórico- VPA), pertencentes aos compostos derivados do ácido hidroxâmico (o Tricostantin A (TSA) e o ácido suberoylanilide hidroxâmico-SAHA) e pertencentes ao grupo das benzamidas e tetrapéptidos cíclicos. Dentre esses inibidores, segundo Duvic e colaboradores (2006), o SAHA foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) para uso em adultos com linfoma cutâneo de células T. Testes in vitro com o Butirato, o VPA e TSA, realizados com células humanas, demonstraram que estes inibidores levam a apoptose, diferenciação e parada do ciclo celular (PIERCE et al, 2012).

Em *S. mansoni*, alguns trabalhos já demonstraram que HDACi leva a apoptose e a hiperacetilação de histonas, afetando significativamente a transcrição gênica (DUBOIS et al, 2009; AZZI et al, 2008). De acordo com Pierce e colaboradores (2012), testes *in vitro*, utilizando esquistossômulos e vermes adultos, demonstraram que os inibidores VPA, SAHA e TSA inibiram 80% da atividade global de HDAC e causaram a morte do parasito nessas duas fases. Marek e colaboradores (2013) relataram que parasitos silenciados para este gene são incapazes de se desenvolver normalmente no hospedeiro e há a diminuição da postura de ovos na ausência desta proteína. Esses estudos confirmam que as enzimas modificadoras de histonas são importantes alvos terapêuticos e potenciais novas drogas contra esquistossomose podem ser criadas se baseando em HDACi.

Inibidores de HAT também demonstraram capacidade de causar apoptose em células tumorais, sendo que alguns derivados de plantas medicinais, como a curcumina, induziram hipoacetilação em células cancerígenas, demonstrando sua capacidade como potenciais inibidores (BALASUBRAMANYAM et al, 2004; STIMSON et al, 2005). Estudos recentes em *S. mansoni*, demonstraram que o inibidor de HAT, PU139, afetou o sistema reprodutivo de fêmeas de vermes adultos e o desenvolvimento de ovos viáveis (CARNEIRO et al, 2014).

Estudos utilizando inibidores de HMT e HDM são menos frequentes, mas algumas pesquisas já demonstraram que o cloroacetil derivado da allantodapsone, um inibidor de PRMT1, apresentou inibição seletiva por essa metiltransferase, afetando o crescimento de células tumorais (BISSINGER et al, 2011). Inibidores de KDM1, uma HDM, são considerados compostos promissores também da terapia contra o câncer (WANG et al, 2011). Estudos realizados pelo nosso grupo, em que esquistossômulos silenciados por RNA de interferência para PRMT3 e KDM1/2 foram inoculados em camundongos, mostraram que essas enzimas são importantes para a reprodução do *S. mansoni*, uma vez que após 40 dias de infecção foram encontrados um baixo número de ovos no fígado e fêmeas de vermes adultos recuperados após perfusão apresentaram ovários subdesenvolvidos (MOURÃO, manuscrito em preparação).

Figura 8 - Metilação das histonas



Com a cromatina compactada os fatores de transcrição não têm acesso ao DNA, a adição dos grupos metil por HMT relaxa a cromatina, ocorrendo a expressão gênica. A retirada desses grupos por HDM faz com que a cromatina se condense novamente, ocorrendo o silenciamento gênico. Fonte: Modificado de CAVALCANTE BRUIN, 2009

Bromodomínios são proteínas cujo domínio reconhece resíduos de lisina acetilada, como os presentes nas caudas aminoterminais das histonas. A partir do reconhecimento desses resíduos, essas proteínas são capazes de recrutar a maquinaria de transcrição celular para a região do DNA onde se encontra uma histona específica, modulando a transcrição gênica (NTRANOS; CASACCIA, 2015). Yao e colaboradores (2015) demonstraram que o inibidor do Bromodomínio 4 (BRD4) induziu apoptose de células cancerígenas, validando os bromodomínios como potenciais alvos terapêuticos.

Além das enzimas modificadoras de histonas, outras proteínas são capazes de realizar modificações epigenéticas. A metilação no DNA é uma alteração comum e ocorre tipicamente nos domínios dinucleotídeos citosina-guanina (as chamadas ilhas CpG) (WANG et al, 2015). As enzimas responsáveis pela metilação no DNA são denominadas metiltransferase do DNA (DNMT). É sabido que as DNMTs são reguladoras da transcrição gênica durante a carcinogênese, o que motivou o estudo das mesmas como alvo de terapia, contribuindo para o desenvolvimento de inibidores que possam ser utilizados na terapia contra o câncer (MENSCHIKOWSKI et al, 2015). Proteínas Poly (ADP-ribose) polimerase (PARP) também são fatores responsáveis por modificações epigenéticas. Essas proteínas realizam modificações pós-traducionais e apresentam grande importância na regulação de mecanismos celulares essenciais, como estabilidade do genoma, reparo do DNA, morte celular,

entre outros processos, sendo consideradas alvos promissores de drogas contra o câncer (HERCEG; WANG, 2001).

2 JUSTIFICATIVA

A esquistossomose é endêmica no Brasil, afetando cerca de 25 milhões de pessoas. A falta de alternativa eficiente para o tratamento da esquistossomose demonstra a necessidade de novas pesquisas que envolvam o desenvolvimento de drogas eficazes para serem usadas na terapia anti-Schistosoma mansoni. Nesse sentido, o desenvolvimento de uma plataforma de teste de drogas em S. mansoni se faz necessária, uma vez que não há uma plataforma de triagem de novas drogas para o Schistosoma no país.

Fatores de modificações epigenéticas, como enzimas modificadoras de histonas e proteínas que metilam o DNA, são apontados como potenciais alvos de drogas por terem papel central na regulação das modificações epigenéticas da cromatina e estarem envolvidas em processos que regulam as funções celulares do parasito. Estudos do nosso grupo mostram que as HMEs são vitais para as funções celulares do S. mansoni por influenciarem na maturação do sistema reprodutor, diminuindo a ovoposição e, também, por afetar a sobrevivência do parasito. Estes achados motivaram a escolha dos fatores de modificações epigenéticas como alvos para a validação e estabelecimento de uma plataforma de teste de drogas para as fases larval e adulta do parasito.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Estabelecer e validar uma plataforma de testes de drogas in vitro em *S. mansoni* com a finalidade de identificar compostos eficientes nas fases de esquistossômulo e verme adulto.

3.2 Objetivos específicos

- Definir as metodologias a serem utilizadas na triagem de drogas em esquistossômulos;
- Padronizar ensaios de viabilidade por análise fluorimétrica e visual em esquistossômulos;
- Padronizar ensaios de viabilidade por análise de movimento em vermes adultos
- Triar inibidores de fatores de modificações epigenéticas ativos em esquistossômulos e vermes adultos;
- Determinar o índice de seletividade das drogas ativas em esquistossômulos;
- Selecionar inibidores de fatores de modificações epigenéticas eficazes para serem testadas por farmacocinética e in vivo.

4 METODOLOGIA

4.1 Obtenção do material biológico

Nesse projeto foram utilizadas cercárias da cepa LE do parasito da espécie *S. mansoni* provenientes do Moluscário Lobato Paraense - Laboratório de Helminologia e Malacologia Médica do Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR-FIOCRUZ) e foram gentilmente cedidas pela Dra. Liana Jannotti-Passos. O ciclo do parasito é mantido rotineiramente pelo Moluscário do CPqRR/FIOCRUZ, através de passagens por *Biomphalaria glabrata*, seguido de camundongo ou hamsters e retornando a *B. glabrata*.

4.1.1 Transformação mecânica de cercárias em esquistossômulos

O volume de cercárias obtidas do moluscário foi distribuído em tubos de 50 mL e incubado por 30 minutos em gelo para perda de motilidade das cercária e, em seguida, centrifugados a 1000 rpm, por 3 minutos a 4 °C.

O sobrenadante foi descartado em água fervente e o precipitado ressuscitado em 2mL de meio 199 (Gibco - Life technologies) com 2% de penicilina/estreptomicina (Gibco - Life technologies) utilizando pipetas Pasteur descartáveis. O conteúdo de três tubos foi transferido para um novo tubo de 50 mL. O conteúdo foi passado 4 vezes por seringa com agulha 22G para a quebra das caudas das cercárias.

Para a sedimentação, os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 7 minutos e o sobrenadante removido para que as caudas e as cercárias intactas fossem retiradas. O sedimento foi incubado em garrafas de cultura de 10 mL em estufa de CO₂ a 37°C por 1 hora. Para lavagem das caudas, os parasitos foram transferidos para tubos de 15 mL e deixados à temperatura ambiente para sedimentar, por 7 minutos.

Novamente, com uma pipeta Pasteur, o sobrenadante foi removido e as caudas retiradas. Este processo de lavagem foi repetido 8 vezes, em ambiente estéril (capela de fluxo laminar), sendo que, na última lavagem, o sedimento foi ressuscitado em meio suplementado com 2% de penicilina/estreptomicina e 2% de soro fetal bovino (Gibco - Life Technologies) inativado. A presença de caudas na

suspensão foi observada em microscópio invertido e os esquistossômulos foram contados para que fosse estimada a quantidade a ser utilizada. Em seguida, 100 parasitos eram colocados em poços em placas de 96 poços contendo 200 µL de meio.

4.1.2 Obtenção de vermes adultos

Os animais utilizados neste trabalho foram obtidos do Biotério de Produção do CPqRR-FIOCRUZ e transferidos para o Biotério de Experimentação Animal do Centro de Pesquisa René Rachou (BIOTEX). Este projeto possui aprovação da Comissão de Ética para Uso Animal (CEUA) da Fundação Oswaldo Cruz, sob o número LW13/13. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas com tampa em grade de aço inoxidável e maravalha de pinho autoclavada. Água e ração para os hamsters eram fornecidas ad libitum durante todo o tempo de experimentação.

Fêmeas de hamsters com 6 semanas pesando 120g da linhagem Golden (*Mesocricetus auratus*) foram infectadas com 400 a 500 cercárias imersas em água desclorada (volume máximo de 500 µL/animal). A inoculação foi realizada no dorso, por via subcutânea, utilizando seringa de controle por pressão (Micro-Mate®, Cornwall) e agulha de 21G.

Após 45 dias de infecção, os hamsters foram eutanasiados por overdose, sendo primeiramente anestesiados com Cloridato de Xilazina (10mg/kg) e Cloridato de Ketamina (150mg/kg), por via intramuscular, com agulha de insulina calibre 21G. Posteriormente, foi administrado Thiopental 2,5 % (150mg/kg), por via intraperitoneal, com agulha de insulina calibre 21G (volume máximo 300µl). Após a confirmação da morte, os animais foram perfundidos como descrito por Pellegrino e Siqueira (1965) utilizando salina (cloreto de sódio 0,85%) contendo heparina (2500 unidades/L).

4.2 Inibidores

Os inibidores utilizados nesse trabalho são específicos para HMEs. Um total de 252 compostos foram desenvolvidos e produzidos por colaboradores do consórcio Anti-Parasitic Drug Discovery in Epigenetics (A-ParaDDisE).

Em análises prévias de “docking in silico”, alguns destes novos inibidores foram desenvolvidos para ter maior especificidade para o sítio catalítico de HMEs de *S. mansoni*, sendo, assim, potenciais inibidores contra o organismo.

Dentre os inibidores provenientes do consórcio (A-ParaDDisE) alguns estão divididos em 5 séries denominadas de BSF, TB, TH, MC e Kancera e o restante apresenta nomenclatura própria. Esses compostos foram desenvolvidos pelos colaboradores Dr. Wolfgang Sippl, Dr. Manfred Jung, Dr. Antonello Mai e pela indústria farmacêutica Kancera. Os alvos de cada inibidor estão descritos nos Quadros 1 a 6. Para esses compostos foram realizados três testes *in vitro* em *S. mansoni*, a partir de metodologias previamente padronizadas, e testes de toxicidade *in vitro* em células de mamífero, uma vez que os testes *in vivo* dos compostos ativos identificados deverão ser realizados por outro grupo colaborador do consórcio.

Quadro 1 - Compostos da série BS e utilizados na validação da plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni

Compostos	Alvo	Compostos	Alvo
BSF1	PRMT1/LSD1	BSF34	PRMT1/LSD1
BSF2	PRMT1/LSD1	BSF35	PRMT1/LSD1
BSF3	PRMT1/LSD1	BSF38	PRMT1/LSD1
BSF4	PRMT1/LSD1	BSF39	PRMT1/LSD1
BSF5	PRMT1/LSD1	BSF46	PRMT1/LSD1
BSF6	PRMT1/LSD1	BSF49	PRMT1/LSD1
BSF10	PRMT1/LSD1	BSF51	PRMT1/LSD1
BSF11	PRMT1/LSD1	BSF55	PRMT1/LSD1
BSF12	PRMT1/LSD1	BSF2P	PRMT1/LSD1
BSF13	PRMT1/LSD1	BSF2Em	PRMT1/LSD1
BSF15	PRMT1/LSD1	BSF2E	PRMT1/LSD1
BSF16	PRMT1/LSD1	BSF2H	PRMT1/LSD1
BSF17	PRMT1/LSD1	BSG3	PRMT1/LSD1
BSF18	PRMT1/LSD1	BSHH	PRMT1/LSD1
BSF20	PRMT1/LSD1	-	-
BSF23	PRMT1/LSD1	-	-
BSF24	PRMT1/LSD1	-	-
BSF25	PRMT1/LSD1	-	-
BSF26	PRMT1/LSD1	-	-

Fonte: Elaborado pela autora com dados fornecidos pelo Dr. Wolfgang Sippl

Quadro 2 - Compostos da série TB e utilizados na validação da plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni

Compostos	Alvo
TB5	SmHDAC8
TB7	SmHDAC8
TB8	SmHDAC8
TB9	SmHDAC8
TB10	SmHDAC8
TB12	SmHDAC8
TB15	SmHDAC8
TB16	SmHDAC8
TB27	SmHDAC8
TB55	SmHDAC8
TB57	SmHDAC8

Fonte: Elaborado pela autora com dados fornecidos pelo Dr. Wolfgang Sippl

Quadro 3 - Compostos da série TH desenvolvidos e utilizados na validação da plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni

Compostos	Alvo	Compostos	Alvo
TH31	SmHDAC8	TH72	SmHDAC8
TH32	SmHDAC8	TH75	SmHDAC8
TH33	SmHDAC8	TH76	SmHDAC8
TH35	SmHDAC8	TH77	SmHDAC8
TH36	SmHDAC8	TH78	SmHDAC8
TH39	SmHDAC8	TH83	SmHDAC8
TH42	SmHDAC8	TH85	SmHDAC8
TH57	SmHDAC8	TH92	SmHDAC8
TH58	SmHDAC8	TH101	SmHDAC8
TH60	SmHDAC8	TH104	SmHDAC8
TH61	SmHDAC8	TH112	SmHDAC8
TH65	SmHDAC8	TH114	SmHDAC8
TH66	SmHDAC8	TH115	SmHDAC8
TH69	SmHDAC8	TH117	SmHDAC8
TH70	SmHDAC8	TH119	SmHDAC8
TH71	SmHDAC8	TH120	SmHDAC8

Fonte: Elaborado pela autora com dados fornecidos pelo Dr. Wolfgang Sippl

Quadro 4 - Compostos desenvolvidos pelo Dr. Manfred Jung e utilizados na validação da plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni

Compostos	Alvo	Compostos	Alvo
AH174	Jmj (HDM)	Mz43	SIRT5
Bromosporine	BromoD	PFI-2	Set7/9 (HMT)
CBB1007	LSD1 (HDM)	PU139	HAT
Curcumin	HAT/LSD1	RN-1	LSD1 (HDM)
D_min	Jmj (HDM)	SGC0946	Dot1L (HMT)
D_ox	Jmj (HDM)	SGC-CBP30	BromoD
GSK343	Ezh2 (HMT)	SW55	HDAC
J1075	HDAC	Tranlylcypromim	LSD1 (HDM)
JQ1	BromoD	UNC1215	BromoD
Mz25	SIRT2	Vorinostat	HDAC

Fonte: Elaborado pela autora com dados fornecidos pelo Dr. Manfred Jung

Quadro 5 - Compostos da série MC desenvolvidos e utilizados na validação da plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni

Compostos	Alvo	Compostos	Alvo
MC1575	HDAC	MC3031	HDAC
MC1742	HDAC	MC3073	JmjC (HDM)/KMD7
MC1761	HDAC8	MC3101 (IOX-1)	Jmj (HDM)
MC1783	HAT	MC3163	SIRT6a
MC2050	PARP1	MC3205	LSD1 (HDM)
MC2053	PRMT1	MC3226	SIRT2
MC2055	PRMT4/Ezh2 (HMT)	MC3324	PHDM
MC2059	HDAC	MC3343	DNMT
MC2129	HDAC	MC3358	SIRT1/2
MC2141	SIRT1/2	MC3360	p300a (HAT)
MC2288 3HCL(BIX-01294)	HKMT	MC3422	SIRTi
MC2392	HDAC	MC3465	SIRT2
MC2562	SIRT1a	MC3516	SIRT5
MC2590	HDAC	MC3629	Ezh2 (HMT)
MC2652	LSD1 (HDM)	MC3668 2HCL	DNMT
MC2656	SIRT1/2	MC3707	Ezh2 (HMT)
MC2705 2HCL	DNMT	MC3753	DOT1L (HMT)
MC2780	HDAC	MS275	HDAC
MC2841 (SGI-1027)	DNMT	C-646	p300 (HAT)
MC2907	SIRT1/2	SPV-106	p300i (HAT)
MC2908	Ezh2 (HMT)	UNC0638	HKMT

Fonte: Elaborado pela autora com dados fornecidos pelo Dr. Antonello Mai

Quadro 6 - Compostos desenvolvidos pela empresa Kancera e utilizados na validação da plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni

(continua)

Compostos	Alvo	Compostos	Alvo	Compostos	Alvo	Compostos	Alvo	Compostos	Alvo
IN0000492	SmSIRT2/HDAC8	IN0193541	SmSIRT2/HDAC8	IN0385660	SmSIRT2/HDAC8	IN0438954	SmSIRT2/HDAC8	IN0439891	SmHDAC8
IN0002229	SmSIRT2/SmHDAC8	IN0211295	SmSIRT2/HDAC8	IN0438078	SmSIRT2/HDAC8	IN0438955	SmSIRT2/HDAC8	IN0439892	SmHDAC8
IN0006421	SmSIRT2/HDAC8	IN0239437	SmSIRT2/HDAC8	IN0438365	SmSIRT2/HDAC8	IN0438956	SmSIRT2/HDAC8	IN0439893	SmHDAC8
IN0007742	SmSIRT2/HDAC8	IN0257357	SmSIRT2/HDAC8	IN0438469	SmSIRT2/HDAC8	IN0438957	SmSIRT2/HDAC8	IN0439894	SmHDAC8
IN0012428	SmSIRT2/HDAC8	IN0257476	SmSIRT2/HDAC8	IN0438508	SmSIRT2/HDAC8	IN0439252	SmSIRT2/HDAC8	IN0439896	SmHDAC8
IN0015128	SmSIRT2/HDAC8	IN0262141	SmSIRT2/HDAC8	IN0438539	SmSIRT2/HDAC8	IN0439253	SmSIRT2/HDAC8	IN0439897	SmHDAC8
IN0019440	SmSIRT2/HDAC8	IN0262945	SmSIRT2/HDAC8	IN0438540	SmSIRT2/HDAC8	IN0439254	SmSIRT2/HDAC8	IN0439901	SmHDAC8
IN0027471	SmSIRT2/HDAC8	IN0269324	SmSIRT2/HDAC8	IN0438541	SmSIRT2/HDAC8	IN0439255	SmSIRT2/HDAC8	IN0439902	SmHDAC8
IN0030997	SmSIRT2/HDAC8	IN0269954	SmSIRT2/HDAC8	IN0438542	SmSIRT2/HDAC8	IN0439256	SmSIRT2/HDAC8	IN0439903	SmHDAC8
IN0031117	SmSIRT2/HDAC8	IN0303043	SmSIRT2/HDAC8	IN0438764	SmSIRT2/HDAC8	IN0439306	SmSIRT2/HDAC8	IN0439904	SmHDAC8
IN0034052	SmSIRT2/HDAC8	IN0310897	SmSIRT2/HDAC8	IN0438790	SmSIRT2/HDAC8	IN0439311	SmSIRT2/HDAC8	IN0439909	SmHDAC8
IN0035112	SmSIRT2/HDAC8	IN0341132	SmSIRT2/HDAC8	IN0438805	SmSIRT2/HDAC8	IN0439323	SmSIRT2/HDAC8	IN0439910	SmHDAC8
IN0056943	SmSIRT2/HDAC8	IN0343850	SmSIRT2/HDAC8	IN0438809	SmSIRT2/HDAC8	IN0439324	SmSIRT2/HDAC8	IN0439915	SmHDAC8
IN0060983	SmSIRT2/HDAC8	IN0344753	SmSIRT2/HDAC8	IN0438810	SmSIRT2/HDAC8	IN0439325	SmSIRT2/HDAC8	IN0439916	SmHDAC8
IN0064144	SmSIRT2/HDAC8	IN0345171	SmSIRT2/HDAC8	IN0438811	SmSIRT2/HDAC8	IN0439864	SmHDAC8	IN0439917	SmHDAC8
IN0067716	SmSIRT2/HDAC8	IN0378673	SmSIRT2/HDAC8	IN0438812	SmSIRT2/HDAC8	IN0439876	SmHDAC8	IN0439918	SmHDAC8
IN0140043	SmSIRT2/HDAC8	IN0379111	SmSIRT2/HDAC8	IN0438813	SmSIRT2/HDAC8	IN0439884	SmHDAC8	IN0439919	SmHDAC8
IN0140281	SmSIRT2/HDAC8	IN0379151	SmSIRT2/HDAC8	IN0438814	SmSIRT2/HDAC8	IN0439885	SmHDAC8	IN0439920	SmHDAC8
IN0140282	SmSIRT2/HDAC8	IN0384826	SmSIRT2/HDAC8	IN0438815	SmSIRT2/HDAC8	IN0439886	SmHDAC8	IN0439921	SmHDAC8
IN0140289	SmSIRT2/HDAC8	IN0385096	SmSIRT2/HDAC8	IN0438819	SmSIRT2/HDAC8	IN0439887	SmHDAC8	IN0439922	SmHDAC8
IN0154540	SmSIRT2/HDAC8	IN0385210	SmSIRT2/HDAC8	IN0438909	SmSIRT2/HDAC8	IN0439888	SmHDAC8	-	-
IN0154758	SmSIRT2/HDAC8	IN0385347	SmSIRT2/HDAC8	IN0438910	SmSIRT2/HDAC8	IN0439889	SmHDAC8	-	-

(conclusão)

Compostos	Alvo	Compostos	Alvo	Compostos	Alvo	Compostos	Alvo	Compostos	Alvo
IN0158179	SmSIRT2/HDAC8	IN0385368C	SmSIRT2/HDAC8	IN0438916	SmSIRT2/HDAC8	IN0439890	SmHDAC8	-	-

Fonte: Elaborado pela autora com dados fornecidos pela Kancera

4.2.1 Diluição dos inibidores de HMEs

Os inibidores de enzimas modificadoras de histonas desenvolvidos por colaboradores foram dissolvidos em Dimetilsulfóxido (DMSO) 100% de modo que a concentração final de DMSO a ser adicionada na cultura de parasitos não fosse superior a 1 %.

4.3 Padronização de ensaios de viabilidade por método fluorimétrico em esquistossômulos in vitro

Primeiramente, foram padronizadas duas metodologias para verificar a viabilidade dos parasitos na fase de esquistossômulo. As metodologias testadas foram: - ensaio de fluorescência utilizando alamarBlue® e análise quantitativa de lactato.

4.3.1 Ensaio de viabilidade - alamarBlue®

Parasitos cultivados como descrito no item 1.2 foram pré-incubados por 3 horas a 37° C em placa de cultura preta com 96 poços, contendo, em cada poço, 400, 500, 600, 700 e 800 parasitos, 200 µL de meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2% de penicilina/estreptomicina e 60 µg/mL de Rifampicina (Sigma-Aldrich). Como controles, foi utilizado o inibidor de histona deacetilase da família das Sirtuinas, denominado Salermide (controle positivo, dose IC50), na concentração de 20 µM (adicionado após a pré-incubação) e também parasitos tratados previamente com álcool 70% (controle positivo). Como controle branco da reação, foram utilizados parasitos em poços contendo somente o meio suplementado e DMSO em concentração final de 0,1 %, concentração considerada não tóxica (foi adicionado após a pré-incubação). Foram feitas 3 réplicas biológicas em que haviam 3 réplicas técnicas por placa.

Após 48 horas de exposição aos compostos, foi adicionado 20 µL de alamarBlue® (AbD Serotec) por poço. Após 24 horas da adição do alamarBlue®, a intensidade de fluorescência foi medida no leitor de fluorescência Spectra Max M5 (Molecular Devices) usando um comprimento de onda de excitação de 530 nm e comprimento de onda de emissão de 590 nm. Para calcular a viabilidade dos

parasitos, os valores de unidades de fluorescência do meio contendo DMSO 0,1% é subtraído dos valores do restante dos tratamentos, assim, o controle DMSO 0,1% é usado para normalização dos dados e é considerado como 100% de viabilidade.

4.3.2 Ensaio de viabilidade por análise quantitativa de lactato

Esquistossômulos metabolizam a glicose e têm com o produto final o lactato. Assim, grandes quantidades de lactato no meio indicam a viabilidade dos parasitos. A produção do lactato pelos parasitos pode ser analisada e quantificada por ensaios colorimétricos e fluorimétricos.

Para a padronização do teste utilizamos parasitos tratados com as drogas Mefloquina a 100 μM e Praziquantel a 1nM. Como controles, foram utilizados o inibidor Salermide em concentração de 40 μM (controle positivo, concentração inibitória de 50% da viabilidade – IC50) e também parasitos mortos que foram previamente aquecidos à 65°C por 15 minutos e resfriados a -20°C por 5 minutos (controle positivo). Ainda, como controles, as placas continham poços contendo apenas parasitos em meio com DMSO em concentração final de 0,1% (controle positivo), e poços com meio sem parasitos contendo DMSO em concentração final de 0,1% (controle branco). Posteriormente à padronização do ensaio, os esquistossômulos foram submetidos ao tratamento com os inibidores, a uma concentração final de 10 e 20 μM , utilizando os controles descritos acima.

Após 48 horas de exposição dos parasitos aos inibidores ou drogas, foram retirados 50 μL do sobrenadante das culturas de esquistossômulos e esse volume foi incubado a -80°C por 24 horas para desproteíniaz o meio. Após esse tempo, 4 μL do meio foi retirado para medir a quantidade de lactato a partir do kit Fluorometric L-lactate Assay (Abcam) de acordo com o manual do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 50 μL de padrão de lactato e 50 μL do mix previamente preparado (46 μL de tampão Lactate Assay, 2 μL de sonda e 2 μL de Enzyme Mix). A placa foi incubada na ausência de claridade e após 40 minutos a intensidade de fluorescência foi medida no leitor de fluorescência SpectraMax M5 (Molecular Devices), usando comprimento de onda de excitação de 535 nm e comprimento de onda de emissão de 590 nm. Foram feitas duas réplicas técnicas em cada experimento e duas réplicas biológicas.

Para calcular a viabilidade dos parasitos os valores de unidades relativas de fluorescência do meio contendo DMSO 0,1% são subtraídos dos valores dos tratamentos. Os valores de unidades relativas de fluorescência do meio contendo parasitos expostos somente a DMSO 0,1% são considerados como 100% de viabilidade. A fórmula utilizada para este cálculo está demonstrada abaixo.

$$\frac{\text{UFT} - \text{UFD}}{\text{UFM} - \text{UFD}} \times 100 = \frac{\text{UFT} - \text{UFD}}{\text{UFM} - \text{UFD}}$$

UFT: Unidades de Fluorescência do tratamento com inibidores

UFM: Unidades de Fluorescência do Meio de cultura

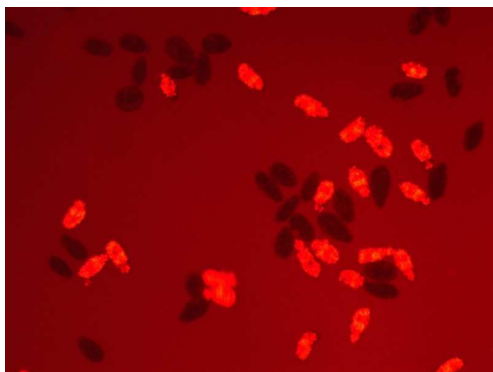
UFD: Unidade de Fluorescência do controle DMSO0,1%

4.4 Ensaio de viabilidade visual utilizando iodeto de propídio

O iodeto de propídio é um marcador que permite analisar a mortalidade de organismos como os esquistossômulos. Assim, os parasitos tratados foram corados com esse marcador para calcular a viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores e para comparação com os resultados das análises com os outros métodos fluorimétricos previamente descritos, alamarBlue® e L-Lactate Assay.

Resumidamente, após a retirada de 50 µL do meio para a análise quantitativa de lactato, como descrito no item anterior, os parasitos foram corados com 5 µg/mL de Iodeto de propídio (Sigma-Aldrich) e analisados sob microscópio invertido de fluorescência (Carl Zeiss Axiovert) (Figura 9) no aumento de 5x e comprimento de onda de 544 nm.

Figura 9 - Esquistossômulos corados com Iodeto de propídio



Esquistossômulos vistos sob microscópio invertido de fluorescência em aumento de 5x após coloração com Iodeto de propídio. Parasitos mortos aparecem corados sob fluorescência, ao contrário de parasitos viáveis. Fonte: Elaborada pela autora

4.5 Determinação de da concentração inibitória de 50% da viabilidade (IC50) em esquistossômulos

Após a confirmação da atividade de alguns dos compostos testados na triagem, foram feitos ensaios de viabilidade de resposta para determinação do IC50. Para isso, os parasitos foram expostos a 6 concentrações diferentes. Para esse fim, 100 parasitos foram cultivados em placa de 96 poços contendo meio 199 suplementado como descrito no 4.3.1 e incubados a 37°C na presença de CO₂. Após 24 horas de incubação, os inibidores foram adicionados para que as concentrações finais fossem 40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM e 1.25 µM. Após 48 horas de exposição os parasitos foram corados com Iodeto de propídio e analisados sob microscópio invertido de fluorescência, como descrito no item 4.4 para a contagem da mortalidade. Para alguns inibidores que apresentaram alta atividade anti-Schistosoma mansoni, foi realizado ensaios com até 9 pontos de concentração (40 µM, 20 µM, 10 µM, 5 µM, 2.5 µM, 1.25 µM, 0.625 µM, 0.3125 µL e 0,15625 µM). Foram realizadas 3 réplicas técnicas para cada inibidor.

Para o cálculo do IC50 foi utilizado o método de interpolação linear de acordo com a fórmula representada abaixo:

$$IC_{50} = \frac{x_1 - 50}{x_2 - 50} \cdot \frac{c_2 - c_1}{c_2}$$

x_1 = < número de esquistossômulos mortos

x_2 = > número de esquistossômulos mortos

c_1 = concentração do inibidor correspondente a x_1

c_2 = concentração do inibidor correspondente a x_2

4.6 Ensaio de toxicidade em células de mamífero

Os ensaios de toxicidade em células de mamífero foram feitos pelo Dr. Policarpo Ademar Sales Junior no âmbito da Plataforma de Ensaio Pré-Clinicos de Triagem de Drogas Anti-Trypanosoma Cruzi (PlaBio).

Para esse ensaio, 4000 células de fibroblasto de camundongo pertencentes a linhagem L929, cultivadas em meio RPMI suplementado com 10 % de soro Fetal bovino (Gibco – Life Technologies) e 1,2 % de Glutamax (Gibco – Life Technologies) foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas por 72 horas a 37°C na presença de CO₂. Após esse tempo, o meio foi substituído por meio RPMI sem fenol red e os compostos foram adicionados em diferentes concentrações, sendo no mínimo 6 pontos de concentração testados (80 µM, 40 µM, 20 µM e 10 µM, 5 µM e 2.5 µM) e 3 réplicas técnicas testadas.

A exposição aos compostos teve duração de 96 horas. Após esse período, 10% de alamarBlue® foi adicionado aos poços. A placa foi incubada por 4 a 6 horas e a absorbância foi medida no Spectra Max M2 sob os comprimentos de onda de 570 (Abs570) e 600 nm (Abs600). Controle com células não tratadas foi utilizado em paralelo. Quadruplicatas foram executadas na mesma placa e os experimentos foram repetidos pelo menos uma vez. Os resultados foram expressos como a diferença na porcentagem de redução entre células tratadas (CT) e células não tratadas (CNT), através da seguinte equação:

$$IC_{50} = \frac{17,216 \cdot Abs_{570} - 30,586 \cdot Abs_{600}}{17,216 \cdot Abs_{570} - 30,586 \cdot Abs_{600}}$$

O cálculo do IC₅₀ sobre as células é realizado como o descrito para esquistossômulos no item 4.5.

4.7 Índice de seletividade

Após os ensaios de IC50 sobre esquistossômulos e células foi possível calcular o índice de seletividade (IS) dos compostos ativos. O IS indica quantas vezes um determinado composto é mais tóxico para os parasitos do que para as células de vertebrado (L929). Para isso o valor de IC50 de um determinado composto sobre as células é dividido pelo valor do IC50 do mesmo em esquistossômulos.

$$IS = \frac{IC50c}{IC50e}$$

IS= Índice de seletividade

IC50c = IC50 do inibidor sobre as células L929

IC50e = IC50 do inibidor sobre esquistossômulos

4.8 Ensaio de viabilidade de vermes adultos in vitro

Para verificar a atividade dos compostos em diferentes fases do desenvolvimento do parasito, inibidores testados em esquistossômulos foram posteriormente testados em vermes adultos. Em ambos os sexos de vermes adultos foram testados 154 compostos e 88 compostos foram testados somente em vermes adultos machos, devido a menor disponibilidade de vermes fêmeas, uma vez que são mais propensas a ruptura durante o processo de separação dos casais.

Para o ensaio, o líquido extravasado da perfusão foi colocado em um recipiente e filtrado em malha fina para a separação dos vermes. Esses vermes foram transferidos para placas de Petri contendo meio RPMI 1640 (Gibco - Life Technologies) suplementado com 2% de penicilina/estreptomicina. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur descartável, o meio foi retirado e substituído por um novo, esse procedimento de lavagem foi repetido 4 vezes e a placa contendo os vermes foi incubada por 30 minutos à 37°C na presença de CO₂. Após esse tempo, os vermes machos foram separados das fêmeas e cada gênero foi lavado novamente, como descrito anteriormente. Os vermes foram transferidos para placas de cultura de 24 poços (8 vermes por poço) contendo 1 mL de meio RPMI 1640 suplementado com 4% de Soro Fetal Bovino e 2% de penicilina/estreptomicina e incubados a 37°C na presença de CO₂.

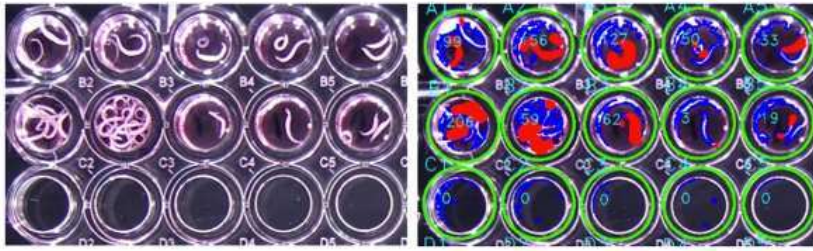
Após 24h de incubação, os vermes foram expostos aos inibidores. Como controle positivo foi utilizado o inibidor de Sirtuína, Salermide, em uma concentração

final de 40 μM e como controle negativo foi adicionado DMSO em uma concentração final de 0,1%. Foram feitas duas réplicas técnicas em cada experimento e duas réplicas biológicas.

Após 24 horas de exposição aos inibidores o movimento dos vermes foi medido utilizando o software WormAssay (MARCELLINO et al, 2012). Esse programa foi desenvolvido para fornecer medidas quantitativas do movimento (denominadas unidades de movimento) de vermes helmintos, nematódeos, entre outros macroparasitas de importância médica, com o intuito de fornecer um ensaio de viabilidade in vitro de alto desempenho. Para isso, as placas contendo os vermes foram filmadas durante 1 minuto e 30 segundos todos os dias, durante 10 dias (Figura 10). O software reconhece os poços e fornece o total de unidades de movimento de cada poço. Para calcular a viabilidade, os valores de unidades de movimento dos vermes tratados foram normalizados com os valores de unidades de movimento do controle (vermes expostos a DMSO 0,1%), assim, o controle foi considerado 1. Para a normalização foi utilizada a fórmula descrita abaixo.

$$\begin{aligned}
 \text{Viabilidade} &= \frac{\text{Unidades de movimento do poço tratado}}{\text{Unidades de movimento do poço controle}} \\
 &= \frac{\text{Unidades de movimento do poço tratado}}{\text{Unidades de movimento do poço controle}} \times 100\%
 \end{aligned}$$

Figura 10 - Análise do movimento de vermes adultos de *S. mansoni* pelo WormAssay



Vermes adultos de *S. mansoni* distribuídos em poços de placas de cultura de 24 poços. À esquerda está a imagem visualizada antes do funcionamento do software e à esquerda a imagem visualizada durante o funcionamento do software. O software reconhece cada poço individualmente e fornece valores de unidades de movimento de cada um. Poços sem vermes não apresentam valores de unidades de movimento, sendo que esses valores variam de acordo com o número de parasitos em cada poço, demonstrando a sensibilidade do ensaio. Fonte: adaptado de MARCELLINO, 2012.

4.9 Análises estatísticas

4.9.1 Ensaio de viabilidade alamarBlue®

Para a análise estatística dos resultados do teste de viabilidade utilizando alamarBlue® foi feito o teste de Kruskal-Wallis utilizando o software GraphPad Prism 5. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p corrigido pelo teste de comparação múltipla de Dunn's foi menor que $p < 0,05$.

4.9.2 Ensaio de viabilidade por análise quantitativa de lactato e ensaio visual com iodeto de propídio

Para a análise estatística ensaio de viabilidade por análise quantitativa de lactato e ensaio visual com Iodeto de propídio foi utilizado o teste de Mann Whitney utilizando o software GraphPad Prism 5. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p foi menor que $p < 0,05$.

4.9.3 Ensaio de viabilidade de vermes adultos

Para a análise estatística do ensaio de motilidade foi utilizado o teste ANOVA Two-Way utilizando o software GraphPad Prism 5. As diferenças foram consideradas significativas quando o valor de p corrigido pelo pós-teste de Bonferroni foi menor que $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

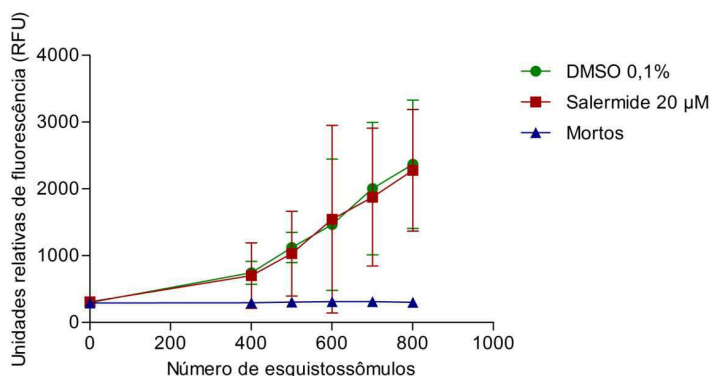
5.1 Padronização de ensaios de viabilidade por método fluorimétrico em esquistossômulos in vitro

5.1.1 Padronização do ensaio de viabilidade com alamarBlue®

Para verificar se o ensaio de viabilidade com alamarBlue® seria um bom método de avaliação de viabilidade de esquistossômulos para a implementação numa plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni, foi realizada a padronização com 8 quantidades de parasitos (conforme descrito no item 4.3.1) e 3 tratamentos diferentes: parasitos expostos somente a 0,1% de DMSO (controle branco); parasitos previamente tratados com álcool 70% (controle negativo) e parasitos expostos a 20 µM do inibidor de Sirtuína, Salermide (controle positivo). Salermide já foi demonstrado por Lancelot e colaboradores (2013) ser ativo em esquistossômulos, induzindo mortalidade e apoptose celular em vermes adultos, em que foi observado a separação dos casais expostos a esse composto e diminuição da postura de ovos e foi utilizado como controle positivo em todos os experimentos descritos neste trabalho.

O intuito dessa padronização foi estabelecer a quantidade apropriada de parasitos a ser utilizada num ensaio fluorimétrico que permitisse alto desempenho na triagem de drogas. A determinação da densidade de parasitos foi necessária para estabelecermos a quantidade de parasitos em que haveria emissão de fluorescência suficiente para termos baixa variabilidade entre as réplicas e possibilidade de diferenciarmos os três tratamentos (controles positivos e negativos e inibidor teste). Os resultados da padronização podem ser observados no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Padronização do ensaio de viabilidade com alamarBlue®



Unidades relativas de fluorescência (RFU) de diferentes quantidades de esquistossômulos após tratamento e adição do alamarBlue®. O controle negativo DMSO 0,1 % está representado pela linha verde e os controles positivos Salermide e mortos representados pelas linhas vermelha e azul, respectivamente. O erro padrão está representado pelas barras em cada ponto. Fonte: Elaborado pela autora com resultados do projeto.

A partir dos resultados é possível observar uma grande variabilidade entre as réplicas, além de um baixo valor de RFU mesmo com um alto número de parasitos. Mansour e Bickle (2010) observaram um valor de RFU superior a 1000 com apenas 100 esquistossômulos, valor, esse, que em nosso ensaio foi encontrado com uma quantidade de 500 parasitos por poço e, mesmo assim, apresentando alta variabilidade entre as réplicas. Quando observados visualmente sob microscópio, os esquistossômulos expostos a Salermide (controle positivo) exibiram maior mortalidade quando comparados ao controle branco, o que não foi observado nesse ensaio de fluorescência (Gráfico 1). Esse fato também foi constatado por Mansour e Bickle (2010), que apesar de não terem utilizado exatamente o mesmo controle positivo, afirmam a baixa sensibilidade e confiabilidade do método quando comparado ao ensaio visual. Somente quando os tratamentos controle branco e Salermide foram comparados ao controle negativo (mortos) foi possível observar diferença significativa ($P < 0,05$). O fato do valor de RFU ser baixo pode ser devido ao leitor de fluorescência usado, já que Mansour e Bickle (2010) utilizaram o Spectramax Gemini (Molecular Devices) e, recentemente, Dr. Raymond Pierce nos afirmou que teve que comprar o mesmo equipamento para que alcançassem leitura

razoável utilizando este método (comunicação pessoal). Também, o grupo de Mansur e Bickle não utilizam mais esta metodologia.

Esse ensaio demonstrou ser pouco sensível com o leitor de fluorescência disponível e utilizado, já que o mesmo não possui as características de excitação, emissão e captura de fluorescência necessárias para utilização deste método para teste de drogas em *Schistosoma*, ou ao menos seriam necessárias grandes quantidades de esquistossômulos, característica que não é considerada ideal para um ensaio de alta performance (RINALDI et al, 2015). Portanto, devido aos baixos níveis de fluorescência, este teste apresentou grande variabilidade entre as réplicas, indicando não ser um bom método para teste de drogas em *S. mansoni*.

Foi ainda testada a leitura utilizando colorimetria, outro aspecto que pode ser utilizado para análise com o reagente alamarBlue®, no entanto a mesma se mostrou ainda menos sensível para diferenciação entre as amostras (dados não apresentados).

5.1.2 Padronização de teste visual utilizando coloração com iodeto de propídio

A análise visual de viabilidade de esquistossômulos é frequentemente realizada por microscópio e visa a identificação de presença de granulosidade intracelular e alterações na forma e movimento do parasito. Essa análise é considerada subjetiva, uma vez que esquistossômulos podem apresentar essas características mesmo estando viáveis (KEISER, 2010).

O ensaio de viabilidade em células utilizando iodeto de propídio foi descrito em 1985 por Jones e Senft que relataram a acurácia desse método para distinguir células viáveis e não viáveis. A utilização do iodeto de propídio em *Schistosoma* vem sendo utilizada a um longo tempo, inclusive pelo nosso grupo (MOURÃO et al, 2009), no entanto, Peak e colaboradores (2010) compararam o uso dessa metodologia em esquistossômulos com a utilização de diacetato de fluoresceína (FDA), que cora células viáveis. Seus resultados demonstraram que o iodeto pode ser utilizado para medir a viabilidade de esquistossômulos, por se tratar de uma metodologia quantitativa, simples, e de baixo custo.

Após a padronização desse ensaio foi visto que na análise visual de parasitos expostos a Salermide a 40 μM foi encontrado uma maior porcentagem de esquistossômulos mortos quando comparado a análise sob microscópio invertido de

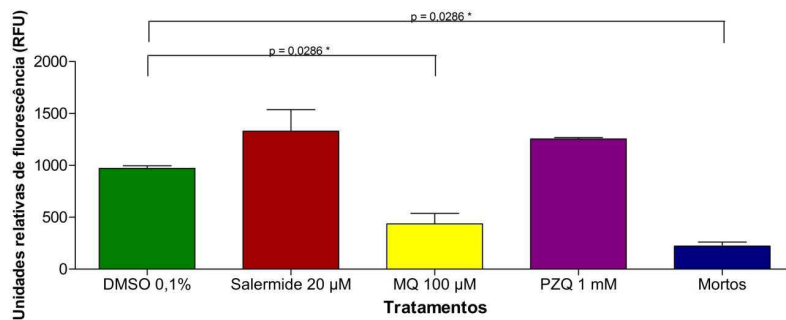
fluorescência após a coloração com iodeto de propídio, confirmando a subjetividade da análise visual, uma vez que parasitos que aparentavam estar mortos, devido a presença de granulações e ausência de movimento, não coraram com o iodeto, indicando que eles permaneciam viáveis mesmo com esse fenótipo.

5.1.3 Padronização do ensaio de viabilidade por análise quantitativa de lactato

Uma vez observado que o teste alarmaBlue não se adequa ao nosso propósito devido à disponibilidade de equipamentos e, ainda, no intuito de padronizar uma plataforma de maior desempenho para teste de compostos anti-Schistosoma mansoni, visamos o estabelecimento de outro ensaio fluorimétrico para avaliar a viabilidade com ensaio de L-lactate Assay de viabilidade de esquistossômulos.

Para a padronização do ensaio utilizando o kit L-Lactate assay foram implementados como controles positivo as drogas: Mefloquina (MQ) a 100 μM e Salermide a 20 μM . Ainda, foram utilizados parasitos expostos a DMSO 0,1% (controle negativo) e Praziquantel (PZQ) a 1 mM (controle para comparação com o artigo em que o teste foi descrito) e foram feitas 3 réplicas biológicas para cada composto testado e desenvolvido para fatores de modificação epigenética. Após 48 horas de exposição aos tratamentos foi realizada a leitura de fluorescência e os resultados são mostrados no Gráfico 2.

Gráfico 2 - Padronização do ensaio de viabilidade por análise quantitativa de lactato



O gráfico representa as médias das unidades relativas de fluorescência (RFU) geradas pelo lactato excretado no meio de cultura de 100 esquistossômulos expostos aos tratamentos. Acima de cada barra está representado o erro padrão. O resultado da análise estatística feita a partir do teste de Mann Whitney está representada pelo valor p obtido após a comparação das médias de RFU de controle DMO 0,1% (barra verde), Salermide 20 µM (barra vermelha), Mefloquina 100 µM (barra amarela), Praziquantel 1mM (barra roxa) e vermes mortos (barra azul). Fonte: Elaborado pela autora com resultados do projeto.

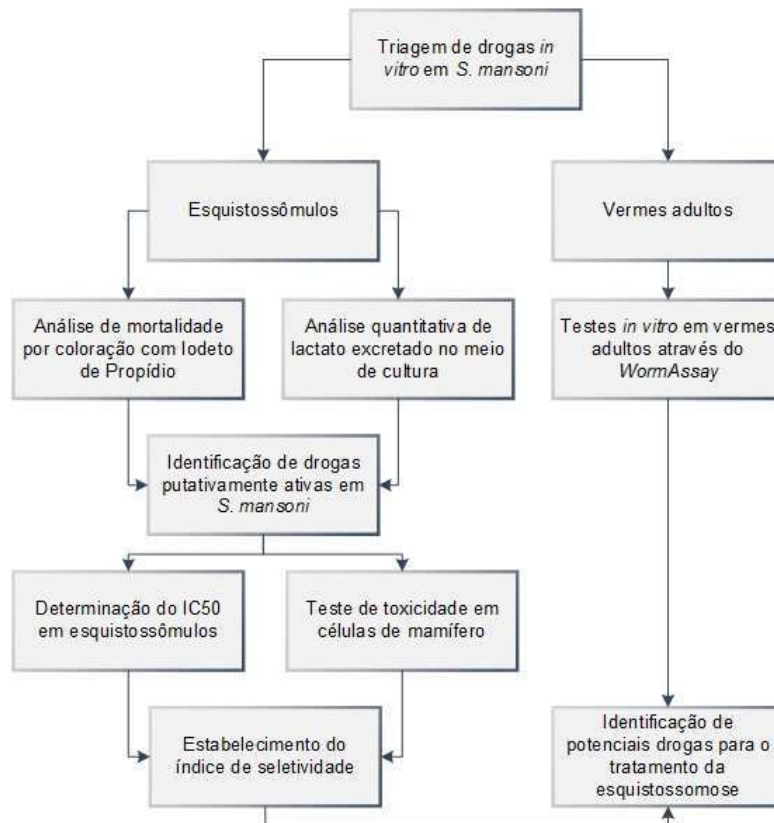
Os resultados apontam baixa variabilidade entre as réplicas do experimento e presença de diferença significativa entre o controle DMSO 0,1% e o controle Salermide 20 µM, Mefloquina 100 µM e com os parasitos mortos (controle positivo). Não houve diferença significativa quando comparado a Praziquantel. A atividade de Praziquantel sobre a fase larval é observada após 3 a 4 semanas de infecção (CIOLI et al, 2014) e Howe e colaboradores (2015) descrevem atividade dessa droga similar ao que foi visto neste trabalho, confirmando que a fase larval do *S. mansoni* apresenta baixa sensibilidade ao Praziquantel. A utilização deste teste em *S. mansoni* foi recentemente descrito e foram testadas as drogas Mefloquina a 100 µM e Praziquantel a 1mM na fase de esquistossômulos (HOWE et al, 2015). Neste trabalho os autores observaram resultados semelhantes ao apresentado no Gráfico 2. Ainda, com este teste, os valores de RFU foram semelhantes aos valores descritos no trabalho desses pesquisadores, confirmando a reprodutibilidade desse ensaio e a possibilidade de implementá-lo.

A mortalidade dos parasitos expostos aos tratamentos foi confirmada por observação visual utilizando iodeto de propídio, ao contrário do que foi anteriormente visto no ensaio com alamarBlue®. Num primeiro momento, o controle positivo Salermide não induziu a mortalidade de 50% dos parasitos, portanto ele foi testado

na concentração de 40 μM por análise visual determinando-se a mortalidade de aproximadamente 50% dos esquistossômulos. Em vista desse resultado, estabeleceu-se o uso do Salermide na concentração de 40 μM para os testes subsequentes. Esse resultado contradiz o que foi visto por Lancelot e colaboradores (2013), em que foi visto a mortalidade de esquistossômulos expostos por 48 horas ao Salermide a 20 μM . Essa contradição pode ser devido as diferentes cepas utilizadas em cada ensaio, uma vez que a sensibilidade do parasito a droga pode variar de acordo com a linhagem. Além disso, o Salermide usado por Lancelot e colaboradores (2013) foi desenvolvido pela empresa Santa Cruz Biotechnology e o composto utilizado nesse trabalho foi fornecido pelo Dr. Antonello Mai, fato que também pode ter ocasionado o contraste de resultados.

A medição de lactato produzido por células vem sendo frequentemente utilizada para análise de viabilidade de células/organismos (MASSIE et al, 2011; MATOS, et al. 2014). A partir dos resultados das padronizações dos ensaios de viabilidade baseado em fluorescência, foi definido um método de análise quantitativa utilizando o lactato como marcador de viabilidade para ser implementado no pipeline para teste de drogas de média-alta performance. Assim, o mesmo foi validado utilizando-se 170 inibidores desenvolvidos para fatores de modificação epigenética.

Após a padronização das metodologias de ensaio de viabilidade em esquistossômulos, foi estabelecido o pipeline representado na Figura 11 para a triagem de drogas em *S. mansoni*.

Figura 11 – Pipeline para teste de drogas em *S. mansoni*

Fonte: Elaborada pela autora

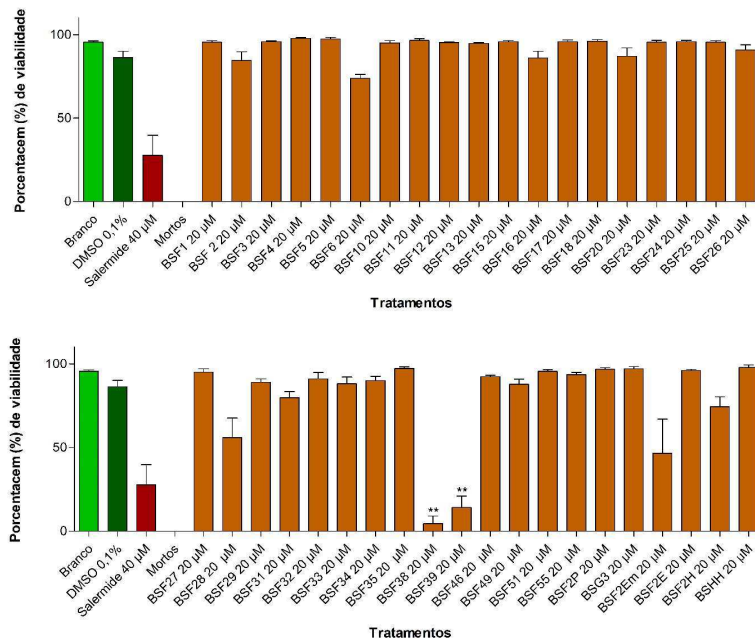
5.2 Teste de inibidores de fatores de modificação epigenética

Após a definição do ensaio de viabilidade de esquistossômulos por método visual por coloração com iodeto de propídio e fluorimétrico, foi realizado uma triagem de compostos, com especificidade para fatores de modificação epigenética. Os compostos que induziram no mínimo 50% de mortalidade/viabilidade, em pelo menos um desses ensaios, foram direcionados para a determinação do IC50 e testes *in vitro* em vermes adultos.

5.2.1 Teste de inibidores por análise de viabilidade visual por iodeto de propídio

Ao todo, para validação da plataforma de teste de drogas anti-Schistosoma mansoni, foram testados por análise de viabilidade visual 251 inibidores desenvolvidos para fatores de modificação epigenética à duas concentrações, 10 e 20 μM . Durante os testes, após 48 horas de exposição dos esquistossômulos aos compostos, a mortalidade dos parasitos foi contada sob microscópio invertido de fluorescência. A porcentagem de viabilidade dos parasitos expostos aos inibidores para LSD1/PRMT1 está representada nos Gráficos 3 – 11.

Gráfico 3 - Viabilidade de esquistossômulos expostos inibidores de PRMT1/LSD1 da série BS a 20 μM analisada por coloração com iodeto de propídio



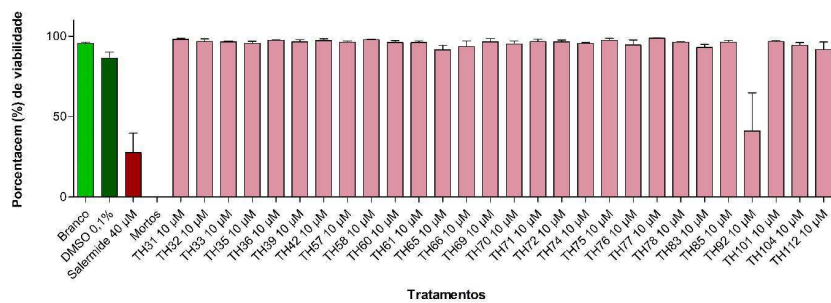
O gráfico representa a média da porcentagem de viabilidade de duas réplicas de esquistossômulos expostos aos inibidores de PRMT1/LSD1 da série BS a 20 μM de concentração final e corados com iodeto de propídio (barras laranja escuro). Em vermelho está representado o controle positivo. Os controles brancos e DMSO 0,1% estão representados pelas barras verdes, clara e escura, respectivamente. Acima de cada barra está representado o erro padrão. A análise estatística feita a partir do teste de Mann Whitney está representada pelos asteriscos acima das barras de erro (p < 0,05 * e p < 0,01 **). Fonte: Elaborado pela autora com resultados do projeto

Os inibidores BSF38 e BSF39, que têm como alvo as HMEs LSD1 e/ou PRMT1, na concentração de 20 μM , reduziram significativamente a viabilidade dos

parasitos em comparação ao controle negativo DMSO 0,1%, sendo o valor p menor que 0,01% para os dois compostos. A redução de viabilidade de esquistossômulos expostos a BSF2Em não foi estatisticamente significativa, porém, a 20 μ M, somente 46,5% dos parasitos estavam viáveis. Com base na porcentagem de viabilidade, os inibidores BSF38, BSF39 e BSF2Em foram considerados ativos, já que a 20 μ M eles induziram a mortalidade de no mínimo 50% dos esquistossômulos.

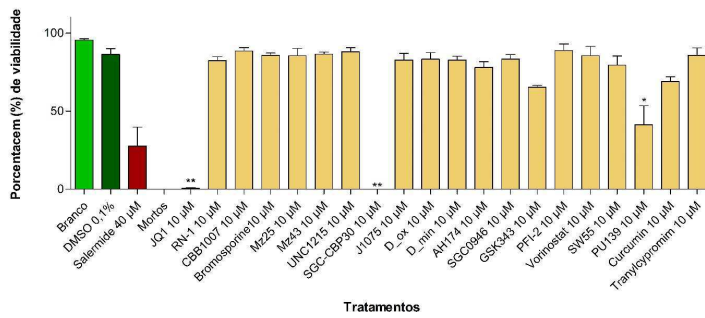
Não foi observada nenhuma atividade nos 39 compostos desenvolvidos para inibidores das enzimas LSD1 e PRMT1 da série BS a 10uM (dados não mostrados). Ainda, esquistossômulos expostos aos 11 inibidores de SmHDAC8 da série TB não apresentaram redução da viabilidade de no mínimo 50%, sendo que a maior redução observada (11,5%) ocorreu em parasitos expostos a TB12 a 20 μ M.

Gráfico 4 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de SmHADAC8 da série TH a 10 μ M analisada por coloração com iodeto de propídio



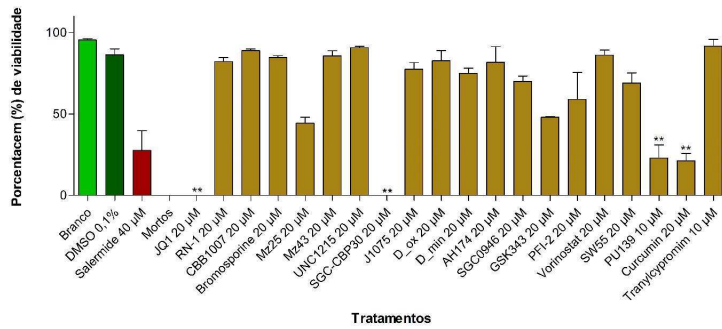
O gráfico representa a média da porcentagem de viabilidade de duas réplicas de esquistossômulos expostos aos compostos da série TH a 10 μ M de concentração final e corados com iodeto de propídio (barras rosa claro). Em vermelho está representado o controle positivo. Os controles brancos e DMSO 0,1% estão representados pelas barras verdes, clara e escura, respectivamente. Acima de cada barra está representado o erro padrão. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Gráfico 6 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC e Sirtuínas a 10 µM analisada por coloração com iodeto de propídio



O gráfico representa a média da porcentagem de viabilidade de duas réplicas de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC e Sirtuínas fornecidos pelo Dr. Manfred Jung a 10 µM de concentração final e corados com iodeto de propídio (barras amarelo-claras). Em vermelho está representado o controle positivo. Os controles branco e DMSO 0,1% estão representados pelas barras verdes, clara e escura, respectivamente. Acima de cada barra está representado o erro padrão. A análise estatística feita a partir do teste de Mann Whitney está representada pelos asteriscos acima das barras de erro, ($p < 0,05$ * e $p < 0,01$ **). Fonte: Elaborado pela autora com resultados do projeto.

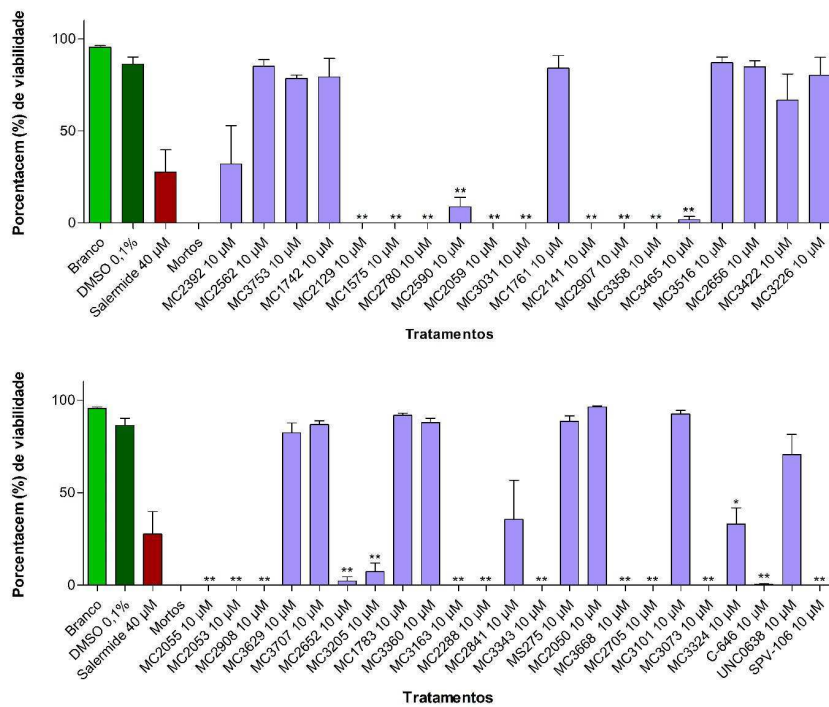
Gráfico 7 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC e Sirtuínas a 20 µM analisada por coloração com iodeto de propídio



O gráfico representa a média da porcentagem de viabilidade de duas réplicas de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC e Sirtuínas pelo Dr. Manfred Jung a 20 µM de concentração final e corados com iodeto de propídio (barras amarelas escuro). Em vermelho está representado o controle positivo. Os controles branco e DMSO 0,1% estão representados pelas barras verdes, clara e escura, respectivamente. Acima de cada barra está representado o erro padrão. A análise estatística feita a partir do teste de Mann Whitney está representada pelos asteriscos acima das barras de erro ($p < 0,05$ * e $p < 0,01$ **) Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

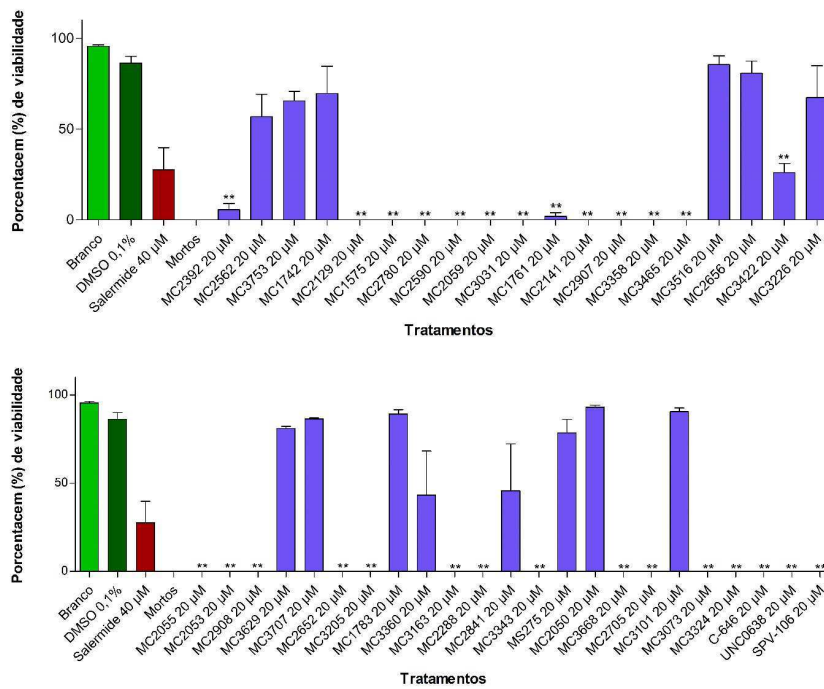
Esquistossômulos expostos aos compostos JQ1, SGC-CBP30, PU139 a 10 e 20 μM e Mz25, GSK343 e Curcumin a 20 μM desenvolvidos para as enzimas que apresentam Bromodomínios (JQ1 e SGC-CBP3), Sirtuína 2 (Mz25), HATs (PU139 e Curcumin), LSD1 (Curcumin) e HMT Ezh2 (GZK343) exibiram redução na viabilidade de no mínimo 50%; essa redução foi considerada estatisticamente significativa nas duas concentrações para os 3 compostos (JQ1, SGC-CBP30 e PU139). Os compostos JQ1 e SGC-CBP30 induziram a mortalidade de aproximadamente 100% dos parasitos nas concentrações de 10 e 20 μM ($p < 0,01$). Esquistossômulos expostos ao Mz25 a 20 μM exibiram 55,7% de redução da viabilidade ($p < 0,05$). O inibidor GSK343 a 20 μM induziu a mortalidade de 52% dos parasitos, porém, quando comparado ao controle DMSO 0,1%, esse valor não foi considerado significativo. Esquistossômulos expostos a PU139, quando comparados a DMSO 0,1%, apresentaram diminuição significativa na viabilidade nas duas concentrações: 58,7% a 10uM ($p < 0,05$) e 77% a 20uM ($p < 0,01$). O inibidor Curcumin não foi ativo a 10 μM , porém a 20 μM induziu mortalidade estatisticamente significativa de 78,7% dos parasitos ($p < 0,01$).

Gráfico 8 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT da série MC a 10 µM analisada por coloração com iodeto de propídio



O gráfico representa a média da porcentagem de viabilidade de duas réplicas de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT da série MC a 10 µM de concentração final e corados com iodeto de propídio (barras roxas claras). Em vermelho está representado o controle positivo. Os controles branco e DMSO 0,1% estão representados pelas barras verdes, clara e escura, respectivamente. Acima de cada barra está representado o erro padrão. A análise estatística feita a partir do teste de Mann Whitney está representada pelos asteriscos acima das barras de erro, ($p < 0,05$ * e $p < 0,01$ **). Fonte: Elaborado pela autora com resultados do projeto.

Gráfico 9 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT da série MC a 20 µM analisada por coloração com iodeto de propídio

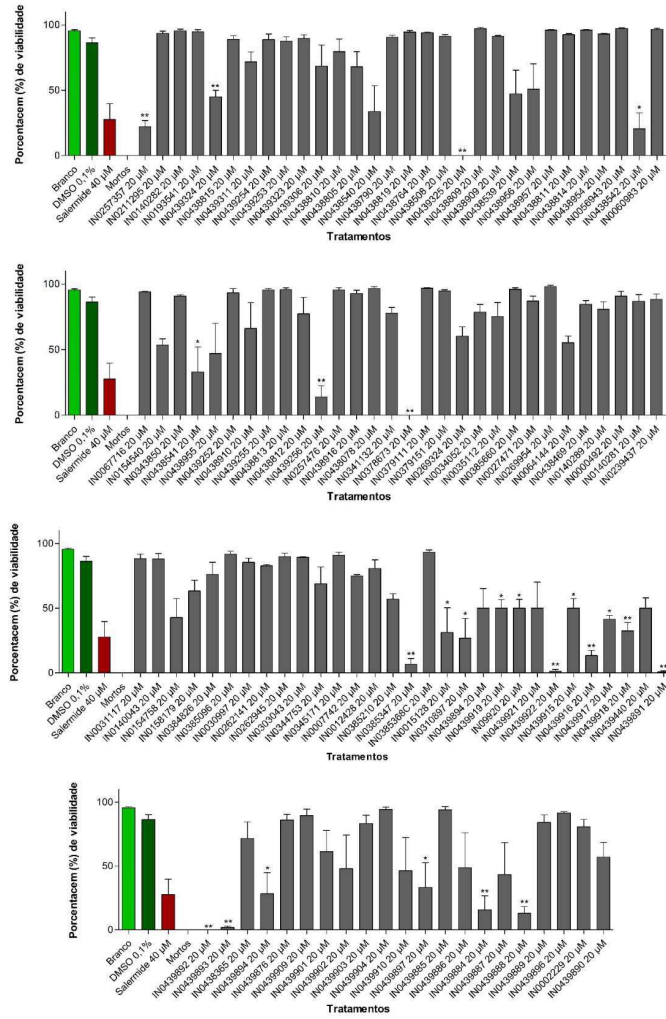


O gráfico representa a média da porcentagem de viabilidade de duas réplicas de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT da série MC a 20 µM de concentração final e corados com iodeto de propídio (barras roxas escuro). Em vermelho está representado o controle positivo. Os controles branco e DMSO 0,1% estão representados pelas barras verdes, clara e escura, respectivamente. Acima de cada barra está representado o erro padrão. A análise estatística feita a partir do teste de Mann Whitney está representada pelos asteriscos acima das barras de erro ($p < 0,05$ * e $p < 0,01$ **). Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

A maioria dos inibidores dessa série foram considerados ativos, sendo 30 em um total de 42 compostos. Dos inibidores ativos, 8 são inibidores de HDACs, 6 são inibidores de Sirtuínas, 5 são inibidores de HMT, 4 são inibidores de HDM, 6 são inibidores de HAT e 4 são inibidores de DNMT. Desses, 19 induziram 100% de mortalidade nos esquistossômulos nas duas concentrações. Todos os compostos que foram considerados estatisticamente significativos, quando comparados a DMSO 0,1%, exibiram o valor de p menor que 0,01%. Somente os inibidores

MC2841 e MC3360 a 20 μM e MC2392 a 10 μM , apresentaram viabilidade menor que 50%, mas não foram estatisticamente significativos.

Gráfico 11 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de Sirtuina 2 e HDAC8 da série Kancera a 20 μ M analisada por coloração com iodeto de propídio



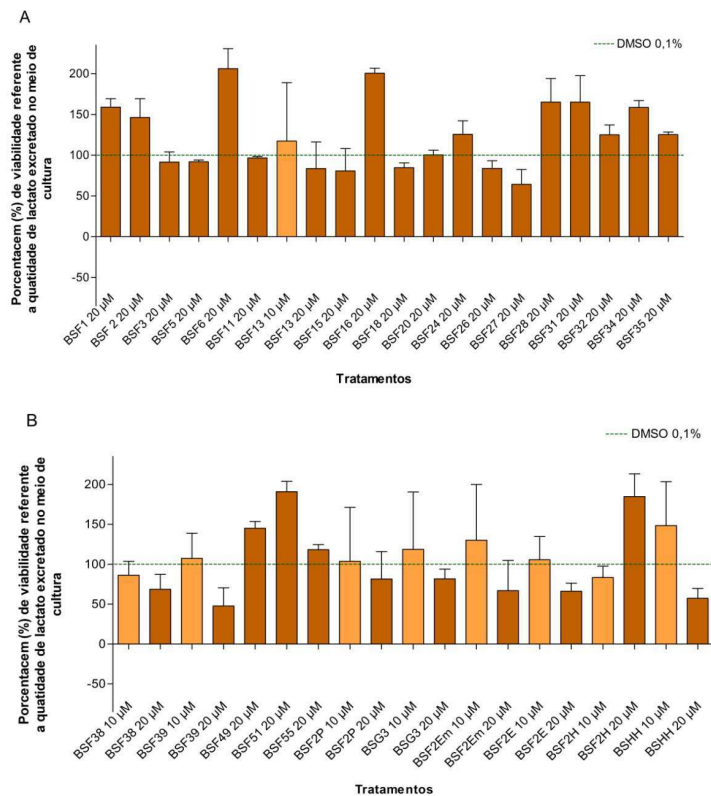
O gráfico representa a média da porcentagem de viabilidade de duas réplicas de esquistossômulos expostos aos inibidores de Sirtuina 2 e HDAC8 da série Kancera a 20 μ M de concentração final e corados com iodeto de propídio (barras cinza escuro). Em vermelho está representado o controle positivo. Os controles branco e DMSO 0,1% estão representados pelas barras verdes, clara e escura, respectivamente. Acima de cada barra está representado o erro padrão. A análise estatística feita a partir do teste de Mann Whitney está representada pelos asteriscos acima das barras de erro ($p < 0,05$ * e $p < 0,01$ **). Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Dos 112 compostos da série Kancera, em que a maioria é desenvolvida para Sirt2 e SmHDAC8, 34 compostos foram considerados ativos. Desses, 13 compostos (IN023786753 (inibidor de SIRT2/hDAC8), IN0439922, IN0439916, IN0439891, IN0439893 (inibidores de SmHDAC8) foram ativos nas duas concentrações, sendo 12 inibidores de SmHDAC8 e 1 inibidor de Sirt2/SmHDAC8. O restante dos compostos (21) foi ativo somente a 20 µM. Dos 34 compostos ativos, 24 exibiram o valor de redução da viabilidade estatisticamente significativo quando comparado a DMSO 0,1% ($p < 0,05$).

5.2.2 Teste de inibidores por análise quantitativa de lactato

Uma vez que uma droga pode afetar a viabilidade do parasito sem que haja mortalidade, é necessária a utilização de um método complementar para detectar alterações metabólicas. Neste caso o ensaio de escolha foi análise quantitativa de lactato presente no meio de cultura. Assim, o meio de cultura de esquistossômulos expostos por 48 horas a 170 inibidores foi analisado por quantificação do lactato. Em princípio, todos os meios de cultura de esquistossômulos expostos a todos os inibidores iriam ser analisados, porém, devido a dificuldade de importação do kit de teste pelo fornecedor, optamos por testar, primeiramente, todos os inibidores que foram considerados ativos no teste por coloração com iodeto de propídio para validação da metodologia e, posteriormente, dos compostos inativos no teste visual. Assim, visamos identificar a perda de viabilidade que não levou a mortalidade dos parasitos, sendo, portanto, uma análise complementar. A porcentagem de viabilidade dos parasitos após a normalização das unidades relativas de fluorescência está representada nos Gráficos 12 – 16.

Gráfico 12 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de PRMT1/LSD1 da série BS por análise quantitativa de lactato

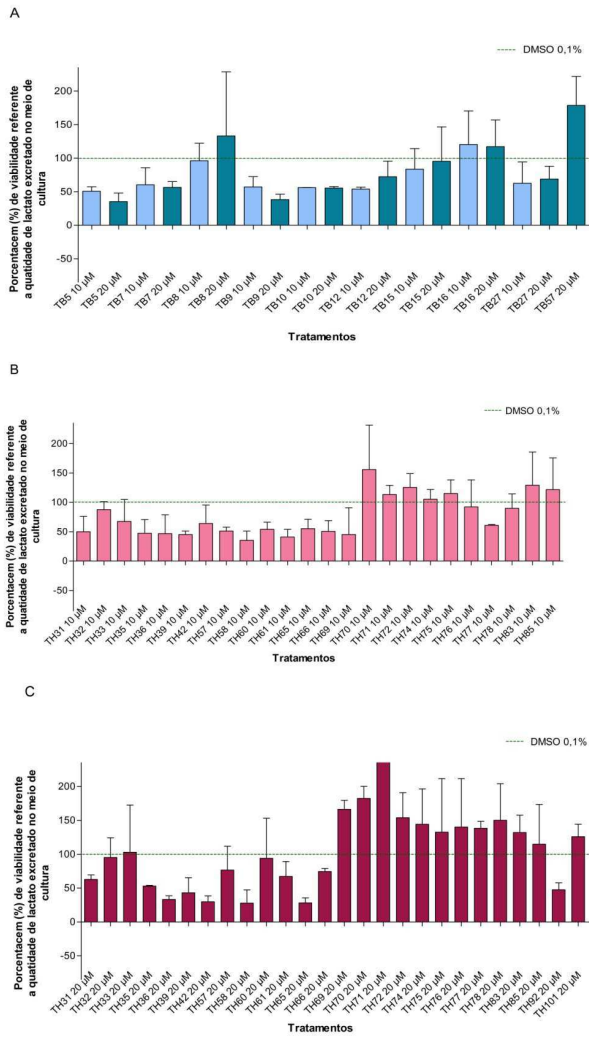


Os gráficos A e B representam a média da porcentagem de viabilidade referente a quantidade de lactato presente no meio de cultura de esquistossômulos expostos aos inibidores de PRMT1/LSD1s da série BS a 10 (barras laranja claro) e 20 µM (barras laranja escuro) de concentração final. Acima de cada barra está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborado pela autora com resultados do projeto.

O meio de cultura de esquistossômulos expostos ao composto BSF39 a 20 µM apresentou diminuição de aproximadamente 52,3% de lactato em relação ao controle DMSO 0,1%, corroborando com o resultado da análise por coloração com iodeto de propídio, confirmando atividade deste composto pelos dois métodos. O meio de cultura de esquistossômulos expostos aos compostos BSF38 e BSF2Em exibiu diminuição de lactato a 20 µM de concentração final, 31,53 % e 33,18%

respectivamente. Esses valores demonstram a atividade desses compostos mesmo não havendo diminuição na excreção de lactato de no mínimo 50%. À vista disto, o ensaio por análise quantitativa de lactato confirmou o que foi visto no ensaio por coloração por iodeto de propídio e os compostos BSF38, BSF39 e BSF2Em foram considerados putativamente ativos em *S. mansoni* e selecionados para a determinação do IC50 e ensaio in vitro em vermes adultos.

Gráfico 13 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de SmHADAC8 da série TB e TH por análise quantitativa de lactato



O gráfico representa a média da porcentagem de viabilidade referente a quantidade de lactato presente no meio de cultura de esquistossômulos expostos aos inibidores de SmHADAC8 da série TB a 10 (barras azul claro) e 20 μM (barras azul escuro) (A) e TH a 10 μM (barras rosa claro) e a 20 μM (barras rosa escuro) (C). Acima de cada barra está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Parasitas expostos aos compostos TB5 e TB9 a 20 μM excretaram uma quantidade menor de lactato no meio de cultura em comparação ao controle DMSO 0,1%, sendo essa diminuição de aproximadamente 64,84% para TB5 e de aproximadamente 61,77% para TB9. Esses resultados demonstram que esses inibidores não induziram grande mortalidade nos esquistossômulos, de acordo com os resultados do ensaio por coloração com iodeto de propídio, mas influenciaram no metabolismo do parasito. Desse modo, esses inibidores foram considerados putativamente ativos em *S. mansoni* e selecionados para a determinação do IC50 e ensaio in vitro em vermes adultos.

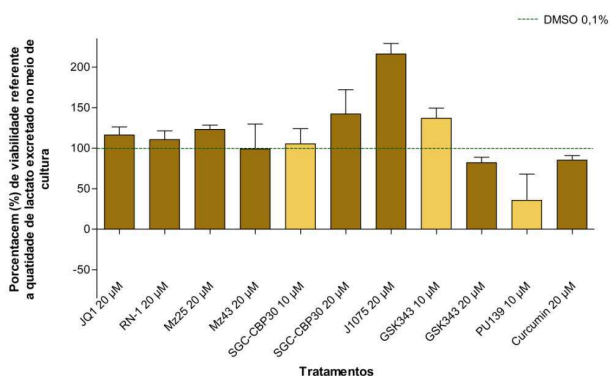
Dos compostos pertencentes à série TH testados, 10 reduziram a excreção de lactato no meio pelos esquistossômulos. TH31, TH35, TH61 e TH69 foram ativos somente a 10 μM , induzindo diminuição de lactato de aproximadamente 50,12%, 52,67%, 59,1 e 54,8%, respectivamente. O meio de cultura de esquistossômulos expostos a esses compostos a 20 μM exibiram diminuição de lactato, porém em menores valores que a 10 μM .

O meio de cultura de parasitos expostos a TH42, TH65 e TH 92 a 20 μM exibiu diminuição de lactato de aproximadamente 70,2%, 71,74% e 52,3%, respectivamente. Esses resultados indicam que TH92 influencia significativamente o metabolismo do *S. mansoni* e induz mortalidade, como foi visto no ensaio por coloração com iodeto de propídio. Os compostos TH36, TH39 e TH58 foram ativos nas duas concentrações, exibindo a 20 μM diminuição de 66,8%, 53,8% e 72,2%, respectivamente, de lactato.

O meio de cultura de esquistossômulos expostos a TH92 a 10 e 20 μM não mostrou presença de lactato.

Em vista do exposto, além de TH92, os inibidores TH31, TH35, TH36, TH39, TH42, TH58, TH61, TH65 e TH69 foram identificados como sendo putativamente ativos e selecionados para a determinação do IC50 e teste in vitro em vermes adultos.

Gráfico 14 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC e Sirtuínas (Dr. Manfred Jung) por análise quantitativa de lactato

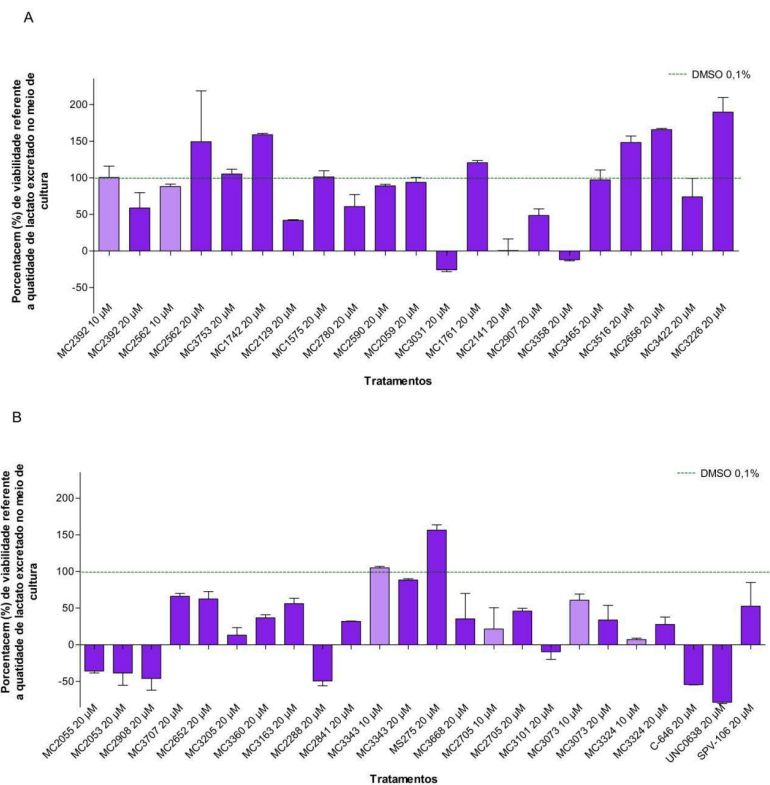


O gráfico representa a média da porcentagem de viabilidade referente a quantidade de lactato presente no meio de cultura de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC e Sirtuínas (Dr. Manfred Jung) a 10 (barras amarelo claro) e 20 µM (barras amarelo escuro). Acima de cada barra está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

O meio de cultura de esquistossômulos expostos a PU139 a 20 µM exibiu diminuição de aproximadamente 64,3% de lactato. Esse composto também induziu mortalidade nos parasitos de acordo com os resultados do ensaio por coloração com iodeto de propídio, confirmando a atividade desse inibidor. Entretanto, não foi observado redução de no mínimo 50% de lactato no meio de cultura de esquistossômulos expostos a JQ1, Mz25, SGC-CBP30, GSK343 e Curcumin, os quais induziram mortalidade de 100%, 55,7, 100%, 52% e 78,7%, respectivamente. Parasitos expostos a esses inibidores excretaram mais lactato no meio de cultura em comparação ao controle DMSO 0,1%. Devido a esse achado foi realizado um teste que consistiu em adicionar o inibidor no meio de cultura sem parasito e avaliar a fluorescência emitida com o intuito de verificar se os altos valores de RFU encontrados se referiam ao lactato excretado pelos esquistossômulos ou às moléculas dos compostos. O valor de RFU gerado foi semelhante ao valor de RFU gerado pelo meio de cultura contendo DMSO 0,1%, indicando que as moléculas dos compostos testados não interferem na emissão de fluorescência.

Para a determinação do IC50 e teste in vitro em vermes adultos foram selecionados como putativamente ativos os compostos GSK343, PU139, Curcumin, JQ1, Mz25 e SGC-CBP30.

Gráfico 15 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT as séries MC por análise quantitativa de lactato



Os gráficos A e B representam a média da porcentagem de viabilidade referente a quantidade de lactato presente no meio de cultura de esquistossômulos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, e DNMT da série MC a 10 μM (barras roxas claras) e 20 μM (barras roxas escuro). Acima de cada barra está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

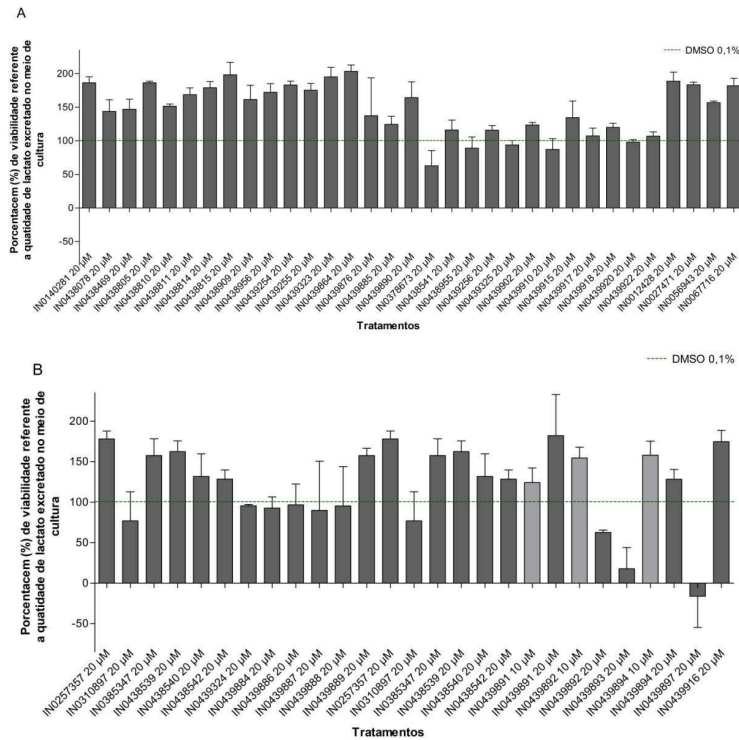
O meio de cultura de esquistossômulos expostos à metade dos compostos testados para análise quantitativa de lactato apresentou redução de no mínimo 50% de lactato, sendo 20 compostos ativos em um total de 40 compostos testados. Dos compostos ativos, MC2055, MC2053, MC2908, MC2288, MC3101, MC3031, MC3358, C-648 e UNC00638 induziram a diminuição de 100% de lactato. Os inibidores MC3660 e MC3101 não provocaram mortalidade de no mínimo 50% dos

esquistossômulos, de acordo com os resultados do ensaio por coloração com iodeto de propídio, mas interferiram no metabolismo desses parasitos, já que houve redução de lactato no meio de 63,2% para parasitos expostos a MC3660 e 100% para parasitos expostos a MC3101.

Dentre os inibidores ativos no ensaio visual por coloração com iodeto de propídio, 10 não induziram redução de no mínimo 50% de lactato, porém o meio de cultura de esquistossômulos expostos aos compostos MC3163 e SPV-106 exibiu diminuição de 43,8% e 47,3% de lactato.

A partir dos resultados encontrados no ensaio por coloração com iodeto de propídio e análise quantitativa de lactato, foram selecionados 31 compostos pertencentes a série MC para a determinação do IC50 e teste in vitro em vermes adultos.

Gráfico 16 - Viabilidade de esquistossômulos expostos aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8 da série Kancera por análise quantitativa de lactato



Os gráficos A e B representam a média da porcentagem de viabilidade referente a quantidade de lactato presente no meio de cultura de esquistossômulos expostos aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8 da série Kancera a 10 (barras cinza-claro) e 20 μM (barras cinza-escuro). Acima de cada barra está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%.
Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Da série Kancera, 55 compostos foram testados para a análise quantitativa de lactato. O meio de cultura de esquistossômulos expostos a IN0439897 e IN0439893 exibiu redução de lactato de 100% e 82,2%, respectivamente. Ambos foram ativos no ensaio visual com coloração com iodeto de propídio. Dentre os 34 compostos que induziram no mínimo 50% de mortalidade no ensaio por coloração com iodeto de propídio, 3 não foram analisados no ensaio por análise quantitativa de lactato, o meio de cultura de esquistossômulos expostos a 10 compostos exibiu diminuição de lactato, porém os valores encontrados foram superiores a 50%. O meio de cultura de

parasitos expostos aos 19 compostos restantes apresentou quantidades de lactato superiores ao meio de cultura de esquistossômulos expostos a DMSO 0,1%. Sendo assim, 34 compostos da série Kancera foram selecionados para a determinação do IC50 e teste in vitro em vermes adultos.

5.2.3 Determinação do IC50, toxicidade em células de mamífero e índice de seletividade

Após a triagem dos inibidores em esquistossômulos, 88 inibidores foram classificados como candidatos ativos contra o parasito. Dentre os quais apenas foi possível a determinação do IC50 em esquistossômulos, por coloração com iodeto de propídio de 56 compostos devido à pouca quantidade disponível de alguns compostos.

O Dr. Policarpo Ademar Sales Junior realizou o teste de toxicidade em células de fibroblasto de camundongo L929 de 29 compostos através da Plataforma de Ensaios Pré-Clínicos de Triagem de Drogas Anti-Trypanosoma cruzi (PlaBio). O número restrito de análise de toxicidade é também devido as quantidades de compostos disponíveis. Os dados de IC50, toxicidade e índice de seletividade estão retratados na Tabela 1.

Tabela 1 – IC50, toxicidade em células de mamífero e índice de seletividade dos compostos ativos em esquistossômulos

(continua)

Composto	IC50 em esquistossômulos	IC50 em L929	Índice de seletividade	Composto	IC50 em esquistossômulos	IC50 em L929	Índice de seletividade
BSF38	15,5	-	-	MC3668	<0,625	-	-
BSF39	16,03	>40	>2,49	MC3101	>20	-	-
BSF2Em	19,51	40	2,0502	MC2705	<0,625	-	-
TB5	>20	-	-	MC3073	1,1259	-	-
TB9	>20	40	<2	MC3324	4,2178	20	4,7418
TH31	>20	-	-	C-646	2,02	-	-
TH35	>20	-	-	UNC0638	11,98	40	3,3389
TH36	>20	-	-	SPV-106	2,2885	70,9	30,982
TH39	>20	-	-	IN0257357	14,505	40	2,7577
TH42	>20	-	-	IN0439324	26,494	-	-
TH58	>20	-	-	IN0438540	14,444	-	-
TH61	>20	-	-	IN0439325	13,007	-	-
TH65	25,59	10	0,3908	IN0438955	>20	-	-
TH69	>20	-	-	IN0438539	19,375	-	-
TH92	9,05	-	-	IN0438956	>20	-	-
JQ1	3,1915	40	12,533	IN0438542	15,144	-	-
Mz25	18,534	-	-	IN0438541	17,069	-	-
SGC-CBP30	-	40	-	IN0439256	11,97	-	-
GSK343	18,846	20	1,0612	IN0378673	<10	-	-
PU139	8,6316	-	-	IN0154758	17,157	>40	>2,33
Curcumin	13,986	-	-	IN0015128	15,787	>40	>2,53
MC2392	<10	80	>8	IN0310897	15,867	<40	<2,52
MC2129	<10	20	>2	IN0439894	10	40	4

Composto	IC50 em		Índice de seletividade	Composto	IC50 em		Índice de seletividade
	esquistossômulos	IC50 em L929			esquistossômulos	IC50 em L929	
MC1575	<10	<40	>4	IN0439919	10	80	8
MC2780	<10	5	>0,5	IN0439920	10	-	-
MC2590	<10	1,25	>0,125	IN0439921	10	-	-
MC2059	<10	5	>0,5	IN0439922	6,8667	-	-
MC3031	1,7434	5	2,8679	IN0439915	10	-	-
MC1761	14,048	-	-	IN0439916	3,0882	-	-
MC2141	2,2339	-	-	IN0439917	15,357	-	-
MC2907	<10	-	-	IN0439918	9,1935	80	8,7018
MC3358	3,1048	-	-	IN0439440	10	-	-
MC3465	<10	-	-	IN0439892	6,4103	40	6,24
MC3422	4,0083	-	-	IN0439893	4,4767	-	-
MC2055	<10	-	-	IN0439894	10	40	4
MC2053	<10	10	>1	IN0439902	19,175	-	-
MC2908	0,3448	10	28,998	IN0439910	19,215	-	-
MC3707	>20	-	-	IN0439897	17,035	40	2,3481
MC2652	<10	80	>8	IN0439886	37,813	-	-
MC3205	<10	-	-	IN0439884	15,449	20	1,2946
MC3360	8,5546	-	-	IN0439887	18,636	-	-
MC3163	<10	38	>3,8	IN0439888	10	40	4
MC2288	<10	-	-	IN0385347	14,195	40	2,818
MC2841	8,9808	-	-	-	-	-	-
MC3343	2,8902	-	-	-	-	-	-

Fonte - elaborada com dados do projeto

Dentre os inibidores testados, o inibidor da enzima acetiltransferase p300, SPV-106, exibiu o maior índice de seletividade - IS=30,98, indicando que esse inibidor é aproximadamente 31 vezes mais tóxico para o esquistossômulo que para a célula L929. O inibidor da metiltransferase Ezh2, MC2908, também exibiu alto índice de seletividade, IS=28,9. É possível afirmar que esses compostos são os mais eficazes em esquistossômulos, pois além de serem extremamente seletivos eles foram considerados ativos nos dois ensaios realizados.

Dos 29 inibidores testados, em que foi possível determinar o índice de seletividade, 25 inibidores apresentaram seletividade superior a 2, com exceção dos inibidores de SmHDAC8 (IN0439884, TB9 e TH65) que exibiram os valores 1,29, <2 e 0,30 de IS, respectivamente. O inibidor de Ezh2, GSK343 apresentou 1,06 de IS. Baseado nesses resultados pode-se concluir que TH65 e TB9 são os compostos menos eficazes na fase de esquistossômulos, uma vez que não induziram mortalidade nos parasitos no ensaio visual, apesar de terem induzido alteração de viabilidade apresentando redução de 72% e 62% do lactato no meio de cultura, respectivamente.

O Praziquantel apresenta um IC50 de 2,2 μM sobre esquistossômulos e de 0,1 μM sobre vermes adultos, sendo o IS >960 em testes realizados com células do mioblasto da linhagem L9 (COWAN, 2015). O composto SPV-106 apresentou o IC50 em esquistossômulos semelhante ao Praziquantel, 2,28 μM , enquanto MC2908 exibiu um valor menor, de 0,34. Ambos os compostos apresentaram alto IS e, mesmo esses valores sendo bem menores quando comparados a Praziquantel, podemos considerar-los como potenciais drogas anti-Schistosoma mansoni.

5.2.4 Comparação do ensaio visual por coloração com iodeto de propídio e a análise quantitativa do lactato

Durante os ensaios, alguns esquistossômulos que apresentaram fenótipos escuros, com granulosidade e arredondados, não foram corados pelo iodeto de propídio, confirmando que apenas a visualização por microscópio denota um ensaio subjetivo. Entretanto, quando vinculado a utilização de um fluoróforo, como o iodeto de propídio, esse ensaio apresenta maior confiabilidade na distinção entre parasitos vivos e mortos (PEAK et al, 2010). No entanto, o iodeto de propídio pode corar

células mortas presentes apenas no tegumento do parasito ainda vivo, portanto o observador deve ser treinado para não considerar esquistossômulos com coloração superficial como mortos. Apesar dessa metodologia demandar a disponibilidade de um microscópio invertido de fluorescência e uma pessoa treinada, ela é muito simples, acessível e de baixo custo.

A coloração por iodeto de propídio pode ser utilizada, portanto, para avaliar presença de mortalidade em esquistossômulos expostos a drogas e não para avaliar viabilidade, uma vez que parasitos vivos não viáveis não se coram por esse reagente. Para a triagem de drogas, a avaliação de redução da viabilidade também é necessária, visto que a droga pode não causar a mortalidade do parasito, mas pode influenciar em sua viabilidade, acarretando alterações significativas para a sobrevivência do mesmo. Além disso, devido as diferentes nuances e a dependência de pessoal treinado, recomendamos que para a triagem de drogas em esquistossômulos sejam utilizados os testes de análise quantitativa de lactato e ensaio visual com iodeto de propídio para análise de viabilidade do parasito.

Figura 12 – Diagrama de Venn dos compostos ativos nos ensaios de iodeto de propídio e lactato



O diagrama representa os inibidores ativos testados em esquistossômulos de acordo com o método utilizado. O ensaio visual por coloração com iodeto de propídio está identificado pela cor vermelha e a análise quantitativa de lactato pela cor azul. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do trabalho.

Os resultados da análise quantitativa de lactato confirmam a necessidade da realização de um ensaio que visa identificar compostos capazes de alterar o metabolismo do parasito e, conseqüentemente, sua viabilidade, uma vez que em 48 horas de exposição à droga pode não causar a mortalidade do parasito,

impossibilitando que a presença de atividade seja constatada no ensaio visual, mas pode influenciar em seu metabolismo, circunstância que pode levar a inviabilidade do parasito. Esse fato ocorreu nos ensaios de triagem em esquistossômulos, em que 15 inibidores que foram inativos no ensaio por coloração com iodeto de propídio induziram a redução de lactato excretado no meio de cultura de esquistossômulos tratados, sendo considerados ativos após esse teste (Figura 12).

Dentre os compostos testados com a metodologia de lactato, o meio de cultura de esquistossômulos expostos a 32 inibidores que induziram mortalidade nos parasitos, como relatado nos resultados por coloração com iodeto de propídio, exibiu altos valores de unidades relativas de fluorescência (Figura 12). Assim como o ensaio homogêneo usando o substrato ZMAL que emite fluorescência ao se ligar a Sirtuína, que foi usado para validar as Sirtuínas como potenciais alvos de droga em *S. mansoni*, é um ensaio suscetível a interferência de compostos com forte fluorescência (SCHIEDEL et al, 2015). A metodologia de análise quantitativa do lactato do meio de cultura também pode estar sujeita a interferência, já que alguns compostos cristalizam em contato com o meio e podem emitir fluorescência no comprimento de onda analisado.

Neste trabalho, alguns dos compostos que apresentaram este viés foram testados dissolvidos em meio de cultura sem parasitos e lidos juntamente com a sonda para lactato. Foi observado que a emissão de fluorescência para os compostos testados foi semelhante à emissão do meio sem drogas nestes casos. Outra explicação para o ocorrido seria que os esquistossômulos expostos a esses inibidores excretaram grande quantidade de lactato no meio de cultura em algum momento antes de morrer.

Na literatura são descritos trabalhos em que, na maioria deles, somente foi utilizado uma única metodologia para testar drogas em esquistossômulos. Li e colaboradores (2015) realizaram a triagem de 59360 inibidores da glutathione redutase, SmTGR, somente em esquistossômulos, a partir do ensaio fluorimétrico baseado na emissão de fluorescência gerada devido a redução da glutathione e validaram apenas 1,56% dos compostos. Yousif e colaboradores (2012) realizaram uma triagem de 309 extratos de plantas em vermes adultos, a partir da análise visual de viabilidade e selecionaram 14% desses compostos como ativos. Kuhn e colaboradores (2010) testaram 14300 compostos em vermes adultos, a partir do

método fluorescente baseado na emissão de fluorescência quando o substrato é ligado à enzima alvo SmNACE (enzima catabolizadora de NAD+) e selecionaram apenas 1% dos compostos. Nosso trabalho demonstra a necessidade da utilização de metodologias paralelas e complementares, uma vez que utilizando somente o iodeto de propídio, por exemplo, um menor número de drogas seriam selecionadas como ativas e como consequência, potenciais drogas seriam excluídas. Em vista do exposto, as contribuições dos trabalhos que visam a identificação de novos compostos terapêuticos contra a esquistossomose poderiam, talvez, ser mais efetiva caso fossem utilizados mais de um método para a triagem de drogas e em diversas fases do parasito para a confirmação de atividade dos compostos, uma vez que, desde a década de 70, o tratamento da esquistossomose consiste na utilização de uma única droga, o Praziquantel.

O meio de cultura de esquistossômulos expostos a 9 compostos da série MC e 1 composto da série Kancera apresentou valores de RFU menores que o meio de cultura de esquistossômulos mortos. Esse fato também pode ser devido aos cristais formados quando o inibidor entra em contato com o meio, uma vez que a presença destes pode interferir na emissão e captura de fluorescência pelo leitor. É importante ressaltar que para o estabelecimento de uma plataforma de médio-alto desempenho, não cabe o teste de solubilidade de cada um dos compostos. Cada composto enviado pelos químicos colaboradores possuem diferentes estabilidades e solubilidade, sendo apenas protótipos.

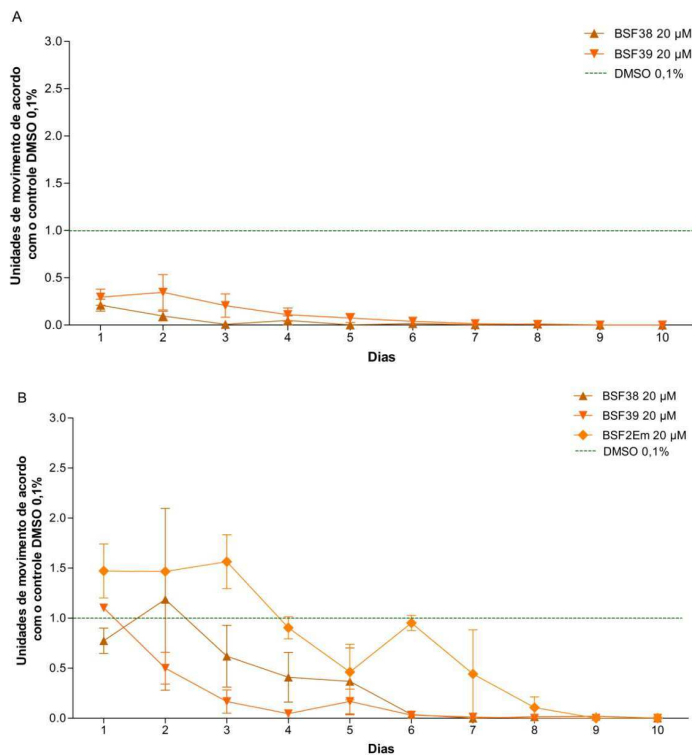
O ensaio de lactato apresenta alto custo, porém é simples, rápido de executar, analisar e com baixa variabilidade. A possível interferência na emissão de fluorescência após a exposição aos compostos, não invalida a triagem de compostos proposta, uma vez que essa metodologia está associada à coloração com iodeto de propídio, possibilitando a seleção de compostos capazes de alterar a viabilidade e/ou induzir mortalidade no parasito.

5.2.5 Testes in vitro em vermes adultos

Devido a grande complexidade do ciclo de vida do Schistosoma, diferentes fases do desenvolvimento dos parasitos possuem diferentes necessidades para sua adaptação ao meio e a suscetibilidade a compostos pode variar de acordo com a

fase deste organismo devido a ativação da expressão gênica. Após a triagem de 252 inibidores em esquistossômulos, todos foram testados em vermes adultos machos analisando o movimento dos vermes utilizando o software WormAssay. Neste momento, devido à restrição de número de animais e a dificuldade de recuperação de fêmeas adultas viáveis, foi dada prioridade para iniciarmos os testes em vermes adultos utilizando os 87 inibidores que foram classificados como putativamente ativos na fase larval. Posteriormente, o número de compostos testados foi sendo expandido, chegando a 154 compostos testados em ambos os sexos e 88 compostos testados somente em machos. O movimento dos vermes tratados foi normalizado com o movimento dos vermes expostos a DMSO 0,1% (controle negativo) e os compostos foram considerados ativos quando os valores de unidades de movimento foram menores que 0,5 no final do experimento (10º dia). Os resultados estão representados nos Gráficos 17-29

Gráfico 17 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de PRMT1/LSD1 ativos em esquistossômulos da série BS



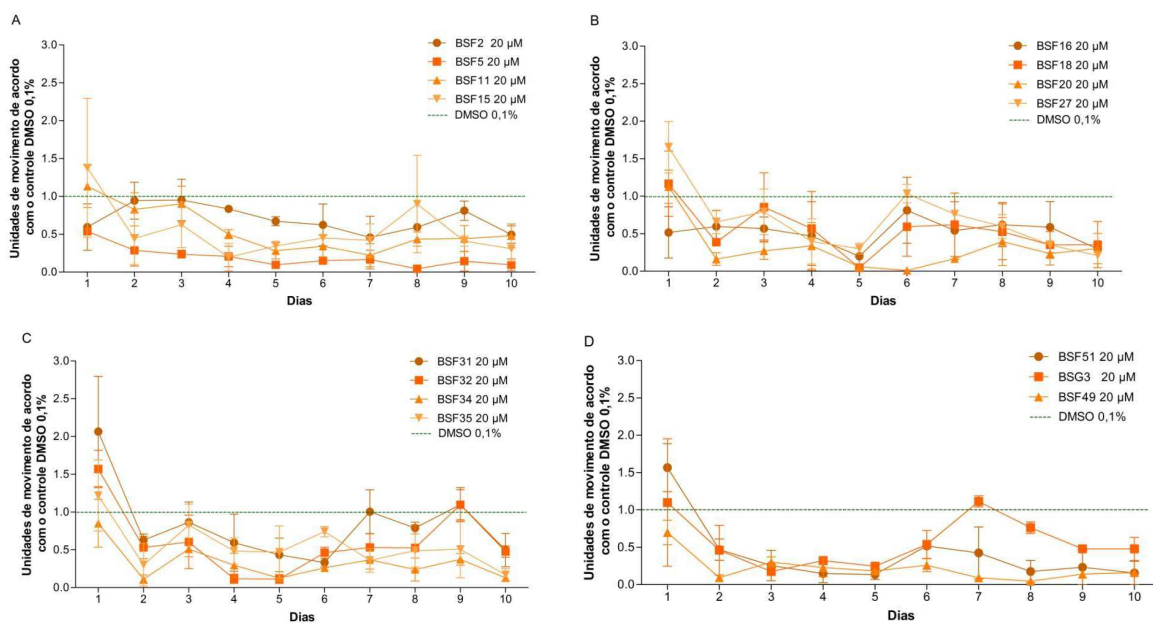
O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos machos (A) e fêmeas (B) expostos aos inibidores de PRMT1/LSD1 da série BS, a 20 μ M de concentração final (linhas laranjas), normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostos a DMSO 0,1% durante 10 dias. Em cada ponto está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Vermes adultos machos e fêmeas expostos a BSF39 exibiram redução do movimento de 70% a partir do 1º dia, para machos ($p < 0,001$), e 50% a partir do 2º dia, para as fêmeas, em relação aos vermes expostos a DMSO 0,1%. A partir do 9º dia o software WormAssay não registrou nenhum movimento dos vermes ($p < 0,001$). Esses resultados evidenciam que o BSF39 é capaz de influenciar a viabilidade do *S. mansoni*, causando sua mortalidade na fase de esquistossômulo e verme adulto.

Vermes machos expostos a BSF38 exibiram redução do movimento de no mínimo 50% a partir do 1° dia e a partir do 9° dia nenhum movimento foi observado ($p < 0,001$). Fêmeas expostas a esse inibidor apresentaram diminuição do movimento de no mínimo 50% a partir do 4° dia e no 10° dia foi registrado 97% de redução do movimento ($p < 0,01$).

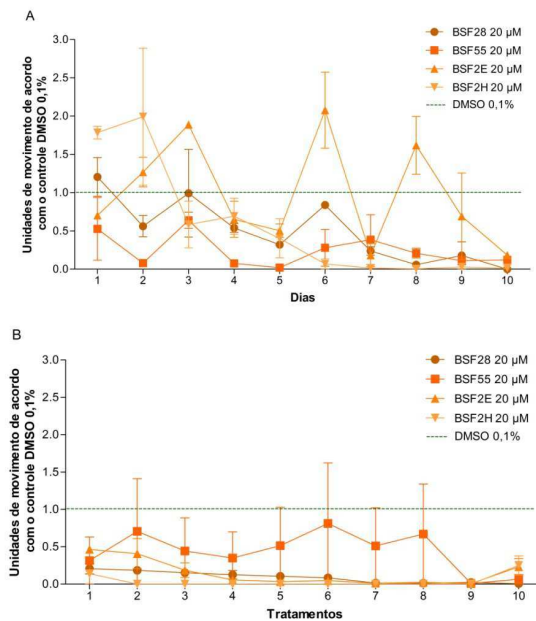
O inibidor BSF2Em não apresentou atividade em vermes adultos machos, entretanto o movimento de fêmeas expostas a esse composto reduziu no mínimo 50% a partir do 5° dia e no 10° dia foi observado 99,7% de diminuição ($p < 0,05$).

Gráfico 18 – Unidades de movimento de vermes adultos machos expostos aos inibidores de PRMT1/LSD1 inativos em esquistossômulos da série BS



O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas (A, B, C e D) expostos aos inibidores de PRMT1/LSD1 da série BS inativos em esquistossômulos, a 20 μ M de concentração final (linhas laranjas), normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostos a DMSO 0,1% durante 10 dias. Em cada ponto está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

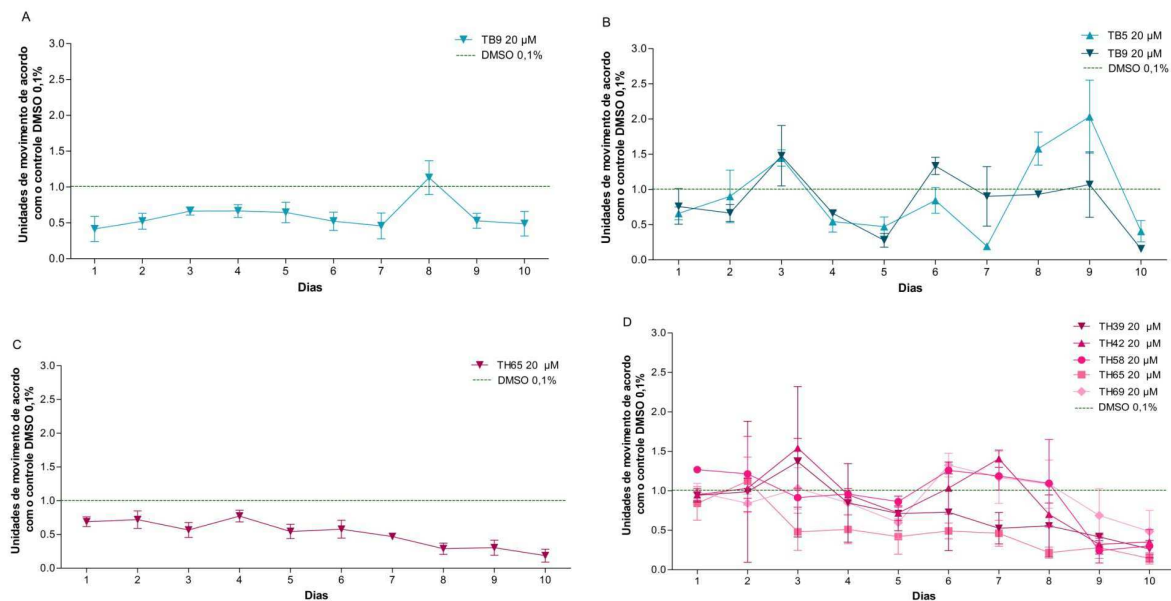
Gráfico 19 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de PRMT1/LSD1 inativos em esquistossômulos da série BS



O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas (A) e machos (B) expostos aos inibidores de PRMT1/LSD1 da série BS inativos em esquistossômulos, a 20 µM de concentração final (linhas laranjas), normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostas a DMSO 0,1% durante 10 dias. Em cada ponto está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Todos os compostos da série BS que não foram ativos em esquistossômulos, foram testados em vermes adultos machos e fêmeas (1 réplica). Dos 32, 15 induziram a redução do movimento de no mínimo 50% somente em vermes fêmeas (Gráfico 18) e 4 nos dois sexos (Gráfico 19).

Gráfico 20 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de SmHDAC8 ativos em esquistossômulos da série TB e TH



O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos machos expostos aos inibidores ativos em esquistossômulos de SmHDAC8 da série TB (A) e TH (C), a 20 µM e de vermes adultos fêmeas expostas aos inibidores ativos em esquistossômulos da série TB (B) e TH (D) a 20 µM (linhas azuis para TB e linhas rosas para TH), normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos expostos a DMSO 0,1% durante 10 dias. Em cada ponto está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Vermes adultos machos expostos a TB5 exibiram redução do movimento de 68% no 3° dia, porém o movimento aumentou ao longo dos dias, e não apresentou diminuição de no mínimo 50% até o 10° dia. Os machos expostos a TB9 apresentaram redução a partir do 1° dia de exposição, de 59% e no 10° dia o software registrou redução de 51,2% (Gráfico 20, A).

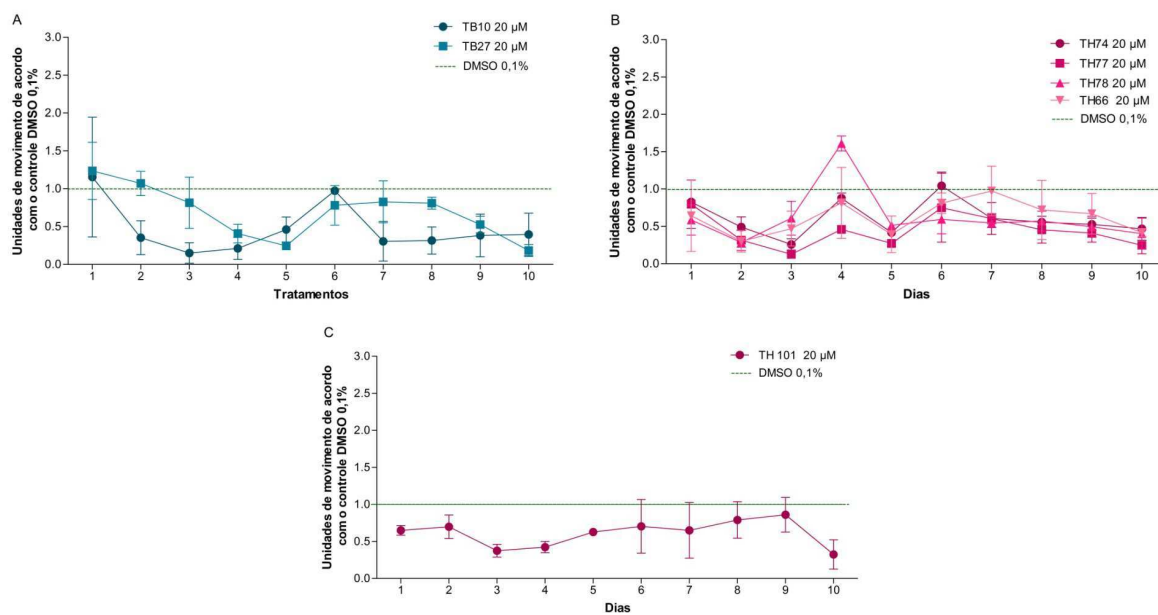
As fêmeas expostas a TB5 exibiram redução de no mínimo 50% a partir do 5° dia e no 10° dia foi registrada diminuição de 60%. Já as fêmeas expostas TB9 apresentaram redução de 72,2% no 5° dia e no 10° dia de 85% (Gráfico 20, B)

O composto TH65 foi o único composto da série ativo nos dois gêneros do verme adulto, sendo que para machos foi observado redução de no mínimo 50% do movimento a partir do 7° dia e no 10° dia de 82% ($p < 0,001$) (Gráfico 20, C). Para as fêmeas expostas a esse inibidor, a redução de no mínimo 50% do movimento foi registrada a partir do 3° dia e no 10° dia esse valor aumentou para 86%, porém essa redução foi significativa somente nos dias 8 ($p < 0,01$) e 9 ($p < 0,05$) de exposição (Gráfico 20, D).

Os inibidores TH39, TH42, TH58 e TH69 apresentaram atividade sobre vermes adultos fêmeas. Para os três primeiros, a redução do movimento se iniciou no 9° dia e no 10° dia exibiram diminuição de 73,9%, 65% e 70%, respectivamente. Fêmeas expostas a TH69 exibiram redução de 51,5% no 10° dia de exposição (Gráfico 20, D).

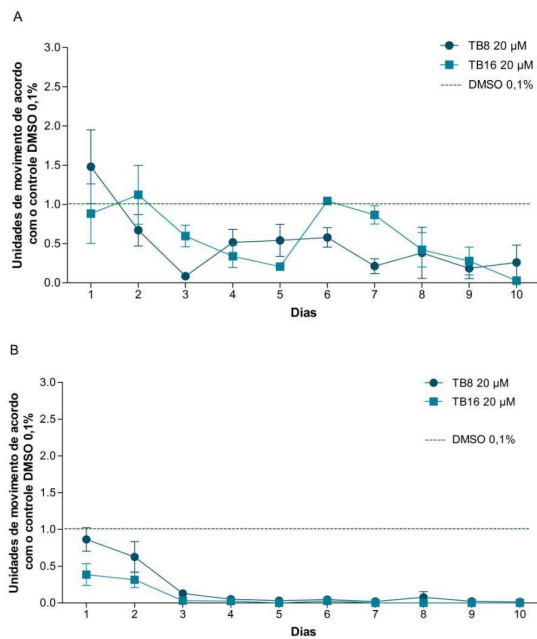
Os inibidores de SmHDAC8 das séries TB e TH não foram ativos em todos os ensaios, sendo TH65 o único composto ativo em esquistossômulos (ensaio de lactato) e nos dois gêneros de vermes adultos. Entretanto, TH65 apresentou grande toxicidade em células de mamífero o que impossibilita afirmar que esse composto é uma potencial droga contra a esquistossomose.

Gráfico 21 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de SmHDAC8 inativos em esquistossômulos da série TB e TH



O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostas aos inibidores inativos em esquistossômulos de SmHDAC8 da série TB (A) e TH (B), a 20 μ M e de vermes adultos machos expostos aos inibidores ativos em esquistossômulos da série TH (C) a 20 μ M (linhas azuis para TB e linhas rosas para TH), normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos expostos a DMSO 0,1% durante 10 dias. Em cada ponto está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

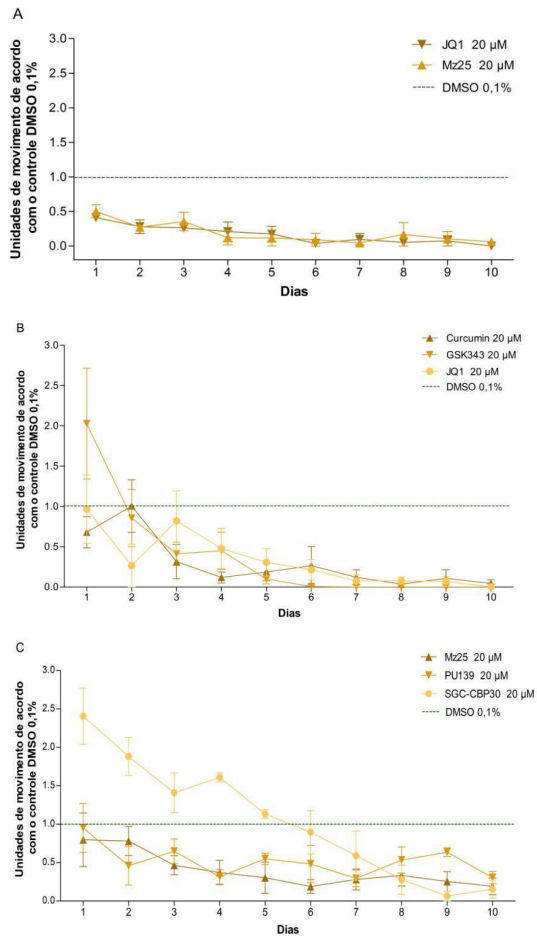
Gráfico 22 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de SmHDAC8 inativos em esquistossômulos da série TB



O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas (A) e machos (B) expostos aos inibidores inativos em esquistossômulos de SmHDAC8 da série TB a 20 µM (linhas azuis), normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos expostos a DMSO 0,1% durante 10 dias. Em cada ponto está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Todos os compostos da série TH e TB que não foram ativos em esquistossômulos foram testados em vermes adultos machos e fêmeas. Com relação à série TH, TH66, TH74, TH77 e TH78 induziram a redução de no mínimo 50% do movimento somente de vermes fêmeas e TH 101 somente de vermes adultos machos (Gráfico 21, B e C). Já na série TB, TB 7 e TB27 induziram a redução de no mínimo 50% do movimento somente de vermes adultos fêmeas expostas a eles (Gráfico 21, A) e TB8 e TB16 em ambos os sexos (Gráfico 22).

Gráfico 23 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC e Sirtuínas, ativos em esquistossômulos (Dr. Manfred Jung)



O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos machos (A) e fêmeas (B e C) expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas (Dr. Manfred Jung) ativos em esquistossômulos a 20 μ M de concentração final (linhas amarelas), normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos machos expostos a DMSO 0,1% durante 10 dias. Em de cada ponto está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Vermes adultos machos exibiram diminuição de no mínimo 50% do movimento quando expostos aos compostos JQ1 e Mz25 a partir do 1° dia e no 10° dia os vermes expostos a JQ1 apresentaram redução de 99,9% do movimento

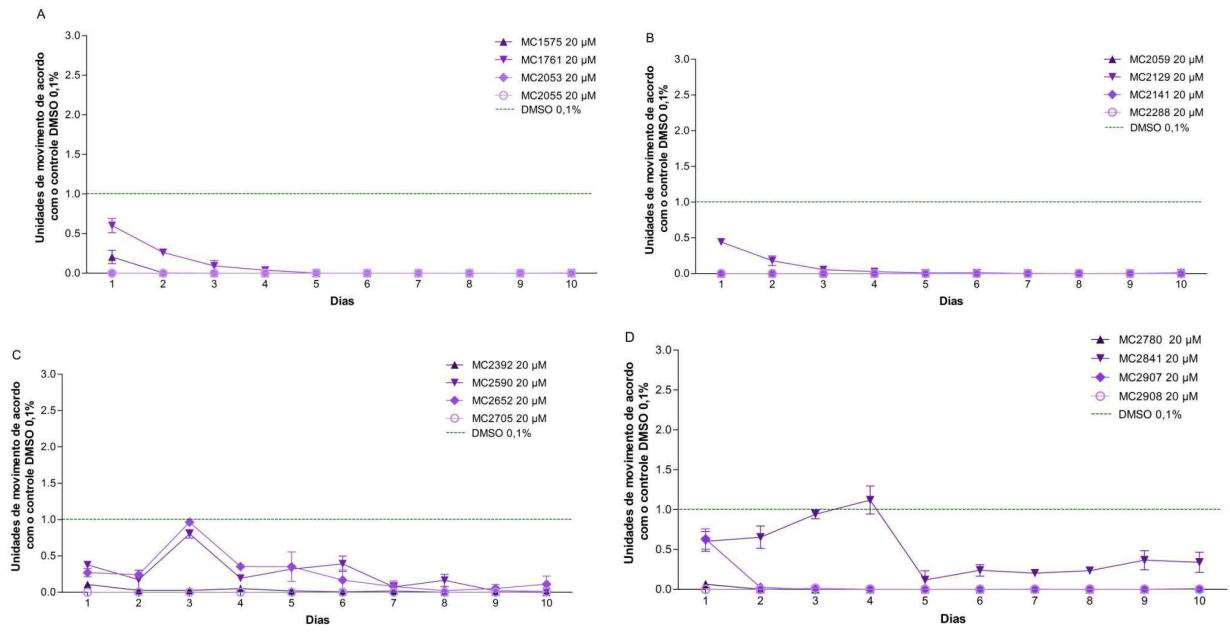
($p < 0,05$) e os vermes expostos a Mz25 exibiram 93,8% ($p < 0,01$) de diminuição (Gráfico 23, A).

Todos os compostos dessa série induziram a redução do movimento das fêmeas. No 10º dia de exposição, fêmeas expostas a Curcumin apresentaram redução de 95,5% ($p < 0,001$), expostas a JQ1 exibiram redução de 99,7% ($p < 0,01$). Quando expostas a Mz25 e SGC-CBP30 o WormAssay registrou 81% ($p < 0,05$) e 84,5% ($p < 0,05$) de diminuição do movimento, respectivamente e as fêmeas expostas a PU139 exibiram 70% de redução do movimento. Vermes adultos fêmeas expostas a GSK343 não se movimentaram a partir do 8º dia ($p < 0,01$) (Gráfico 23, B e C).

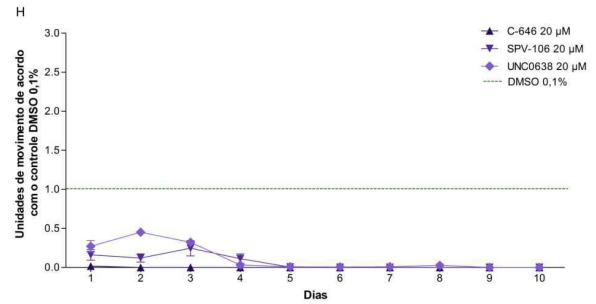
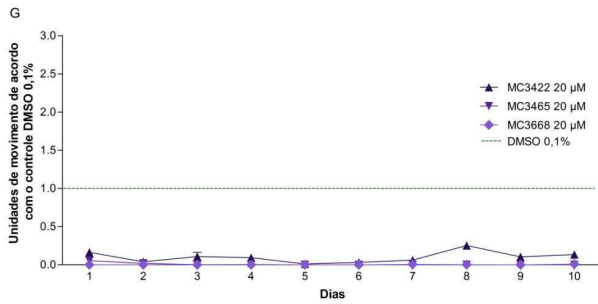
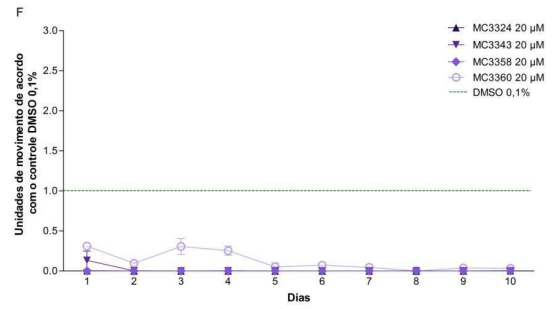
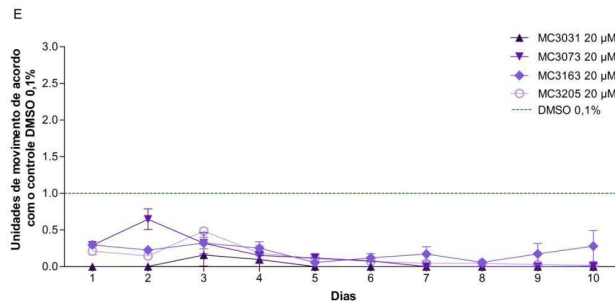
Dentre os compostos inativos em esquistossômulos, 11 foram testados somente em vermes adultos machos, mas nenhum induziu redução de no mínimo 50% do movimento no 10º dia de exposição.

Gráfico 24 – Unidades de movimento de vermes adultos machos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT, ativos em esquistossômulos, da série MC

(continua)



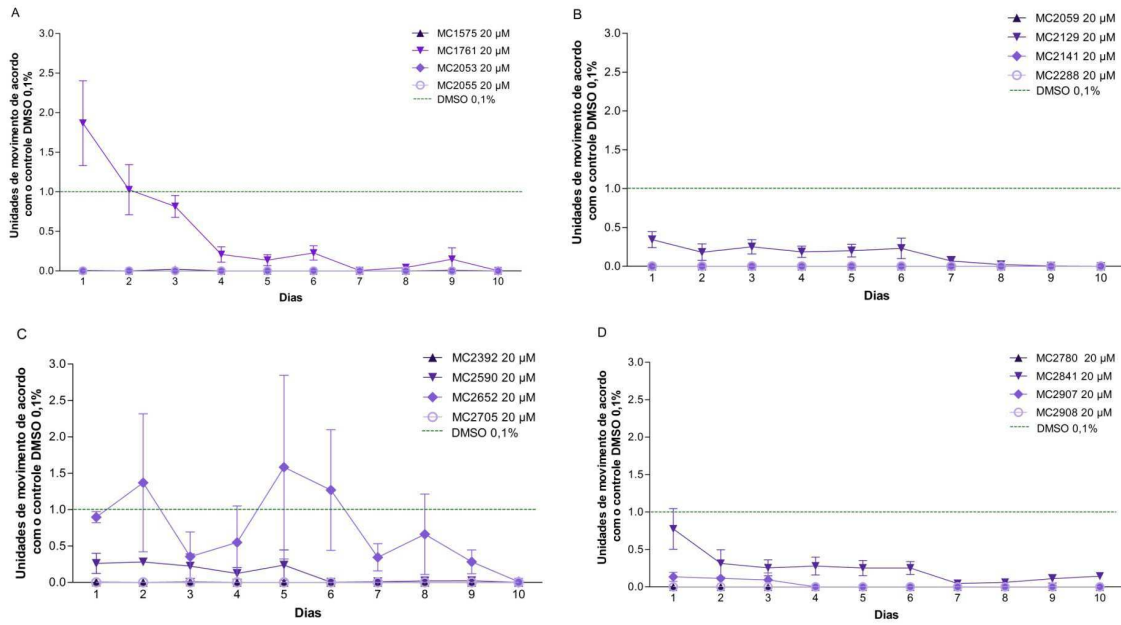
(conclusão)



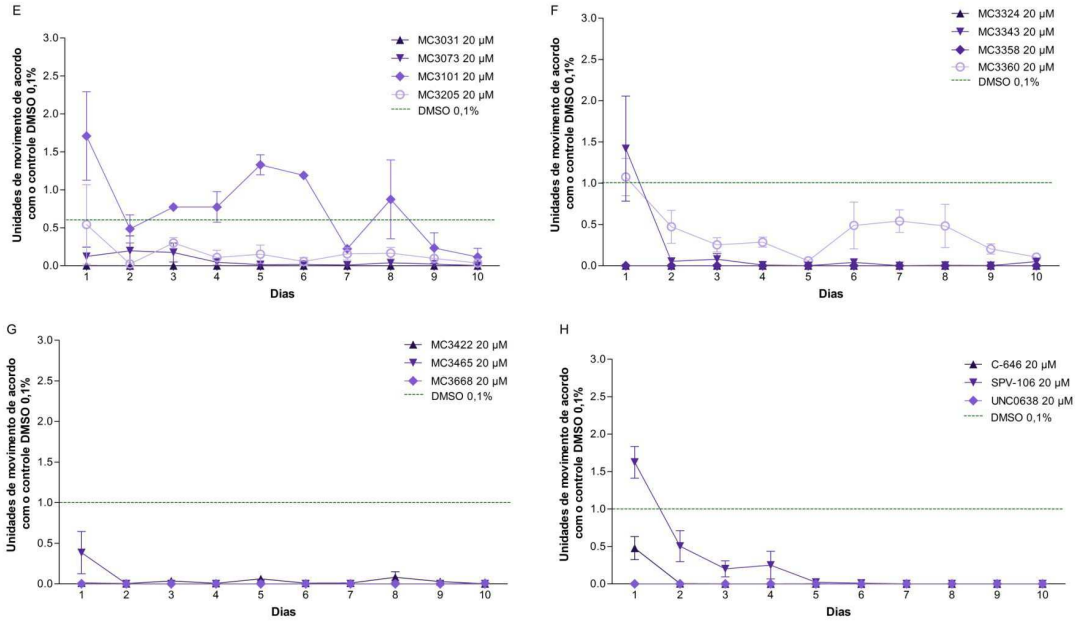
O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos machos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT, ativos em esquistossomos, da série MC, a 20 μ M de concentração final (linhas roxas), normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos machos expostos a DMSO 0,1% durante 10 dias. Em de cada ponto está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Gráfico 25 – Unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostas aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT, ativos em esquistossômulos, da série MC

(continua)



(conclusão)

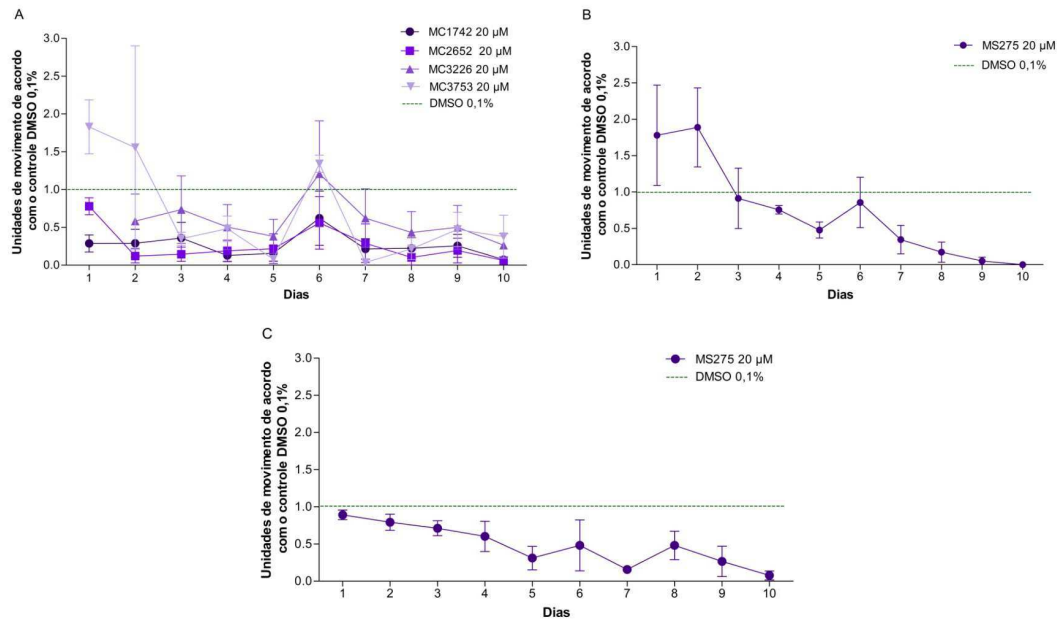


O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostas aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT, ativos em esquistossômulos, da série MC, a 20 µM de concentração final (linhas roxas), normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostas a DMSO 0,1% durante 10 dias. Em cada ponto está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Dos 32 compostos da série MC ativos em esquistossômulos, 28 foram ativos em machos e fêmeas adultos ($p < 0,01$ no 10º dia após exposição), sendo 7 inibidores de HDAC, 5 de Sirtuínas, 3 de HAT, 5 de HMT, 4 de HDM e 4 de DNMT. Somente MC3101 (inibidor da família JMJ de HDM) foi inativo em machos e MC3163 (inibidor da Sirtuína 6) foi inativo em fêmeas. Destes, MC2053, MC2055 (Gráficos 24 e 25, A), MC2141 (Gráficos 24 e 25, B) e MC3358 (Gráficos 24 e 25, F) inibiram 100% da movimentação desde o primeiro contato com a droga, em ambos sexos. Enquanto MC3668, MC3324, MC3031, MC2908 e MC2705, apesar de ativos em ambos os sexos, inibiram 100% da movimentação desde o primeiro contato com o composto apenas em machos (Gráfico 24, C-D) e MC1575, MC2059, MC2288, MC2780, MC2908, e UNC0638 apenas em fêmeas (Gráfico 25, A; B; D; H).

Os machos expostos a 28 compostos ativos apresentaram, no 10º dia, redução de no mínimo 67%, enquanto em fêmeas, 30 dos compostos ativos apresentaram redução do movimento de no mínimo 86% no 10º dia.

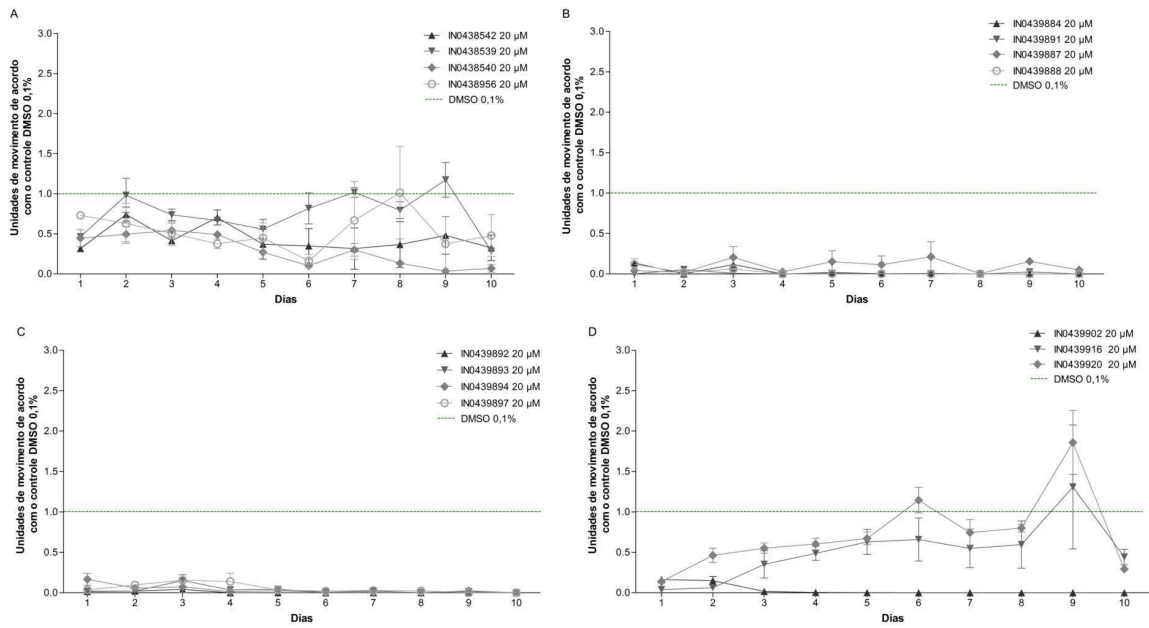
Gráfico 26 – Unidades de movimento de vermes adultos expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT, inativos em esquistossômulos, da série MC



O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas (A e C) e Machos (B) expostos aos inibidores de HDM, HMT, HAT, HDAC, Sirtuínas e DNMT, inativos em esquistossômulos, da série MC, a 20 µM de concentração final (linhas roxas), normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostas a DMSO 0,1% durante 10 dias. Em cada ponto está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Dentre os inibidores inativos em esquistossômulos da série MC, 8 foram testados em vermes adultos machos e fêmeas e 5 foram ativos. Os compostos MC1742, MC2652, MC3226 e MC3753 induziram no mínimo 50% de redução do movimento somente em vermes fêmeas expostas a eles (Gráfico 26, A). O composto MS275 induziu diminuição de no mínimo 50% do movimento em vermes adultos machos (Gráfico 26, B) e fêmeas (Gráfico 26, C).

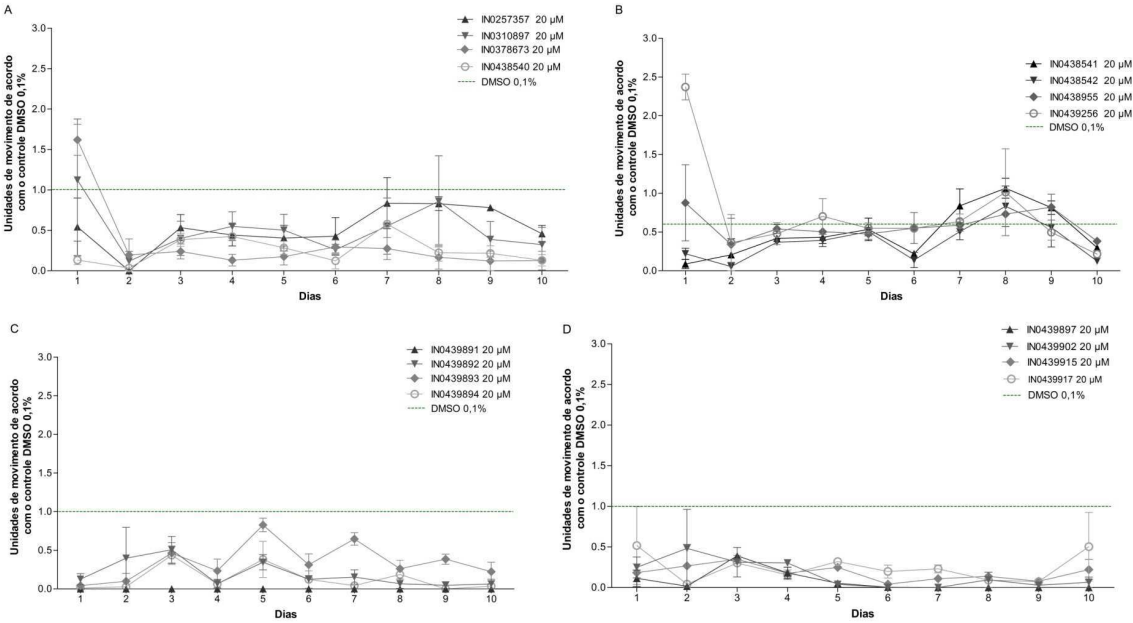
Gráfico 27 – Unidades de movimento de vermes adultos machos expostos aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8, ativos em esquistossômulos, da série Kancera



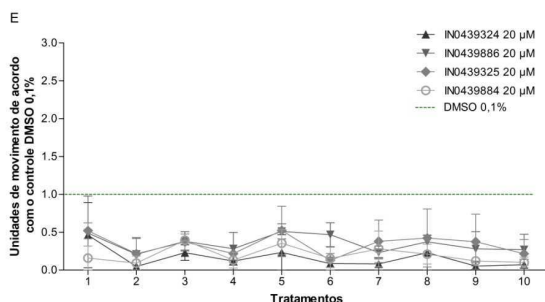
O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos machos expostos aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8, ativos em esquistossômulos, da série Kancera, a 20 µM de concentração final (linhas cinzas), normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos machos expostos a DMSO 0,1% durante 10 dias. Em cada ponto está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Gráfico 28 – Unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostas aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8, ativos em esquistossômulos, da série Kancera

(continua)



(conclusão)



O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostas aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8, ativos em esquistossômulos, da série Kancera, a 20 µM de concentração final (linhas cinzas), normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostas a DMSO 0,1% durante 10 dias. Em cada ponto está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Vermes adultos machos (Gráfico 27) e fêmeas (Gráfico 28) expostos aos inibidores de SmHDAC8 e/ou SmSirtuína 2, IN0438540, IN0438542, IN0439884, IN0439887, IN0439888, IN0439891, IN0439892, IN0439893, IN0439894, IN0439897 e IN0439902, exibiram diminuição de no mínimo 50% do movimento desde o 1º dia de exposição. Fêmeas expostas ao inibidor IN0439891 não exibiram nenhum movimento desde o primeiro dia de contato com a droga.

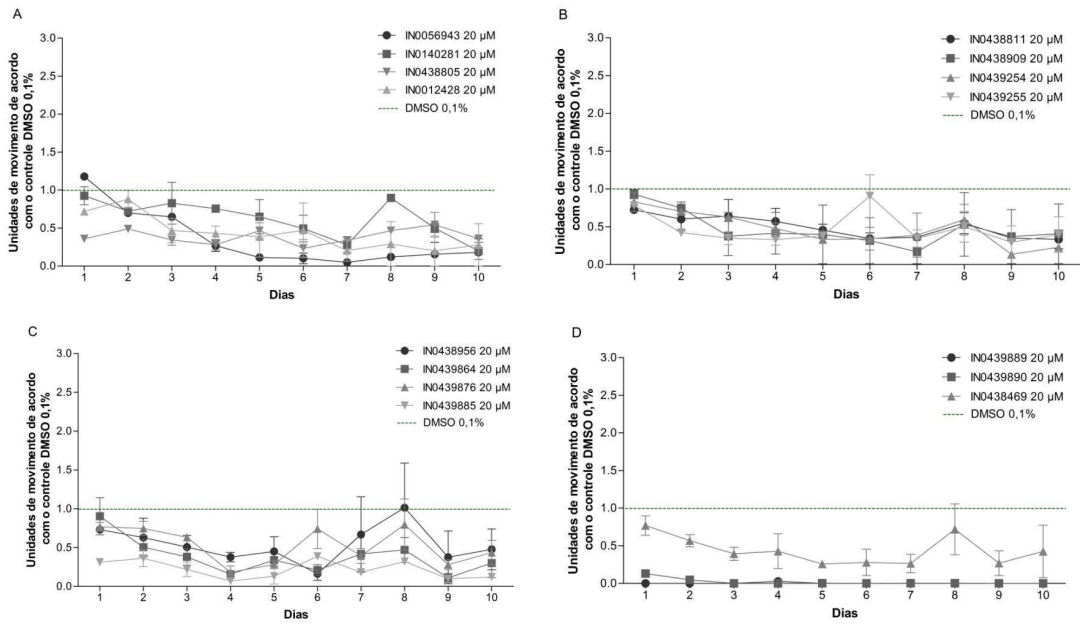
Os compostos IN0438539, IN0438956 (Gráfico 27, A), IN0439916 e IN0439920 (Gráfico 27, B) apresentaram atividade somente sobre os machos, provocando redução de no mínimo 50% do movimento desde o 1º dia, apenas, vermes expostos a IN0438956, que foram a partir do 3º dia de exposição.

Os inibidores IN0257357, IN0310897, IN0378673 (Gráfico 28, A), IN0438541, IN0438955, IN0439256 (Gráfico 28, B), IN0439897, IN0439902, IN0439915 (Gráfico 28, D) IN0439324, IN0439325 e IN0439886 (Gráfico 28, E) foram ativos somente nas fêmeas, as quais exibiram redução de no mínimo 50% do movimento a partir do 1º ou 2º dia.

Machos expostos a IN0439884, IN0439886, IN0439887, IN0439888, IN0439891, IN0439892, IN0439893, IN0439894, IN0438540 e IN0439897, enquanto, fêmeas expostas a IN0439888, IN0439891, IN0439892, IN0439893, IN0439894, IN0439897, IN0439902, IN0438542, IN0438955, IN0439256, IN0439324, IN0439325, IN0439884, IN0439886, IN0439887, IN0439888, IN0439891, IN0439892, IN0439893, IN0439256, IN0439324, IN0439325, IN0439884,

IN0439886 e IN0439887 exibiram redução significativo do movimento, ($p < 0,05$) no 10º dia de exposição.

Gráfico 29 – Unidades de movimento de vermes adultos machos expostos aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8, inativos em esquistossômulos, da série Kancera



O gráfico representa a média das unidades de movimento de vermes adultos machos expostos aos inibidores de Sirtuína 2 e HDAC8, inativos em esquistossômulos, da série Kancera, a 20 µM de concentração final (linhas cinzas), normalizadas de acordo com as unidades de movimento de vermes adultos fêmeas expostas a DMSO 0,1% durante 10 dias. Em cada ponto está representado o erro padrão e a linha pontilhada refere ao controle negativo DMSO 0,1%. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do projeto.

Dos 81 compostos da série Kancera inativos em esquistossômulos, 71 foram testados somente em vermes adultos machos e 6 nos dois sexos. Desses, os inibidores IN0012428, IN0056943, IN0140281, IN0438805, IN0438811, IN0438909, IN0439254, IN0439255, IN0438956, IN0439864, IN0439876, IN0439885, IN0439889, IN0439890 e IN0438469 induziram no mínimo 50% de redução do movimento somente nos machos.

Para o teste de drogas *in vitro* em vermes adultos, algumas metodologias que não se baseiam na observação visual de movimento e mortalidade são descritas na literatura. Dentre elas, podemos citar a análise quantitativa por lactato excretado no meio (HOWE et al, 2015), utilizada para esquistossômulos nesse projeto, análise de alteração tegumentar por microscopia confocal (SILVA et al, 2014) e análise do movimento por impedância (RINALDI et al, 2015).

Howe e colaboradores (2015), em sua descrição recente de um novo método de análise de viabilidade, utilizaram 1 verme adulto macho por poço, que foi exposto por 72 horas aos tratamentos com Praziquantel e Mefloquina e, após análise da quantidade de lactato presente no meio, foi visto a redução da quantidade desse metabólito. A utilização de somente machos e de um parasito por poço não permite validar essa metodologia para testes de drogas em vermes adultos, pois de acordo com a literatura e com os nossos resultados, machos e fêmeas podem reagir diferentemente aos tratamentos e cada indivíduo apresenta suscetibilidade/metabolismo distinto. Sendo assim, para a utilização dessa metodologia, seria necessário um maior número de vermes por poço e os testes deveriam ser feitos em machos e fêmeas, o que aumentaria o custo do ensaio, uma vez que seria necessário o uso de um maior número de kits.

A metodologia de análise do movimento de trematódeos por impedância foi descrita por Smout e colaboradores em 2010 e foi validada em *S. mansoni* por Rinaldi e colaboradores (2015) para teste de drogas. Nesse trabalho, também foi utilizado um verme por poço e foi observado grande variação entre as réplicas e variação na sensibilidade do experimento, que ocorre de acordo com a frequência elétrica (kHz) utilizada, conferindo baixa confiabilidade ao ensaio.

Em vista do exposto, foi escolhida a implementação do WormAssay, desenvolvido por Marcellino e colaboradores (2012) para a análise do movimento em vermes adultos. Mattos e LoVerde (comunicação pessoal, manuscrito em preparação) empregaram essa metodologia com sucesso em *S. mansoni* para estudar genes associados à resistência ao Praziquantel e observaram que fêmeas e machos não poderiam ser avaliados quando pareados, pois, caso a droga a ser testada apresente atividade apenas sobre um dos sexos, o par iria exibir movimento devido à presença da fêmea no canal ginecóforo. Isso caso a droga não seja capaz de desaparecer os vermes e, mesmo nestes casos, não seria possível dizer em qual sexo a droga foi efetiva.

Essa metodologia apresenta como desvantagem a demanda de animais, necessários para a obtenção de vermes adultos, o custo da câmera filmadora e a montagem de um aparato especial de marcenaria. Entretanto, o software está disponível gratuitamente para download. Além disso, o manuseio é simples e nossos ensaios confirmaram a sensibilidade e acurácia do WormAssay. Recentemente, este método foi adaptado para uso na análise de vermes microscópicos, como microfilárias de *Brugia malayi* (STOREY et al, 2014) e pode ser promissor para o estabelecimento de testes de análise de movimento em esquistossômulos nesta plataforma. Esse seria um método extremamente barato já que essa metodologia foi adaptada e está em uso para análise de vermes macroscópicos.

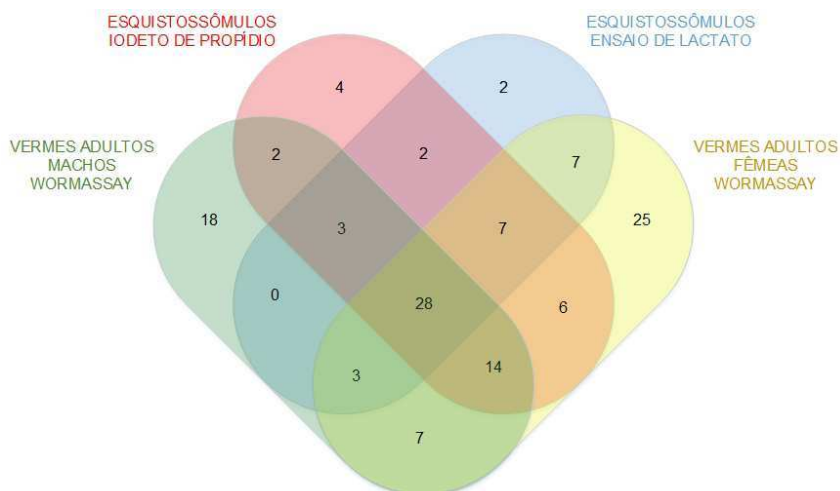
5.2.6 Comparação entre ensaio visual com iodeto de propídio, ensaio de lactato e WormAssay

Nesse trabalho foi possível selecionar um total de 132 compostos ativos em *S. mansoni*. Destes, 73, foram ativos nas duas fases do parasito, 50 foram ativos somente em vermes adultos e 8 foram ativos somente em esquistossômulos (Figura 13).

Dos 29 inibidores ativos em todas as fases e sexos, 11 não são considerados tóxicos em células de mamíferos conforme resultados do índice de seletividade, sendo, portanto, potenciais drogas contra a esquistossomose; 3 exibem toxicidade em células de mamífero; e, para 14, este índice ainda não foi determinado.

Em vermes adultos foram testados 242 compostos, sendo 154 testados em ambos os sexos e 88 testados somente em machos (total dos compostos). Desses, 18 foram ativos somente em vermes machos e 25 somente em vermes fêmeas.

Figura 13 – Diagrama de Venn dos compostos ativos nos ensaios de iodeto de propídio, lactato e WormAssay



O diagrama representa a distribuição dos compostos ativos de acordo com a fase e métodos utilizados. O ensaio em esquistossômulos utilizando a coloração com iodeto de propídio está identificado pela cor vermelha, os ensaios esquistossômulos utilizando a análise quantitativa de lactato está identificado pela cor azul, o ensaio em vermes adultos machos pelo WormAssay está identificado pela cor verde e o ensaio em vermes adultos fêmeas pelo WormAssay está representado pela cor amarela. Fonte: Elaborada pela autora com resultados do trabalho.

Vermes adultos machos e fêmeas exibem desenvolvimento e metabolismo diferenciado e, conseqüentemente, a suscetibilidade de cada sexo a uma determinada droga também é distinta. Estudos realizados por Pica-Mattocchia e Cioli (2004) demonstraram, em infecção com os dois sexos, que vermes adultos machos são mais sensíveis ao Praziquantel. Ainda, esses resultados demonstram que algumas drogas, assim como o Praziquantel, apresentam atividade somente na fase madura do *S. mansoni* (DOENHOFF et al, 2008).

Segundo Anderson e colaboradores (2015), aproximadamente 1341 genes são diferencialmente expressos (mais expressos) em vermes adultos fêmeas, do que em vermes adultos machos. Sendo assim, o fato de um maior número de

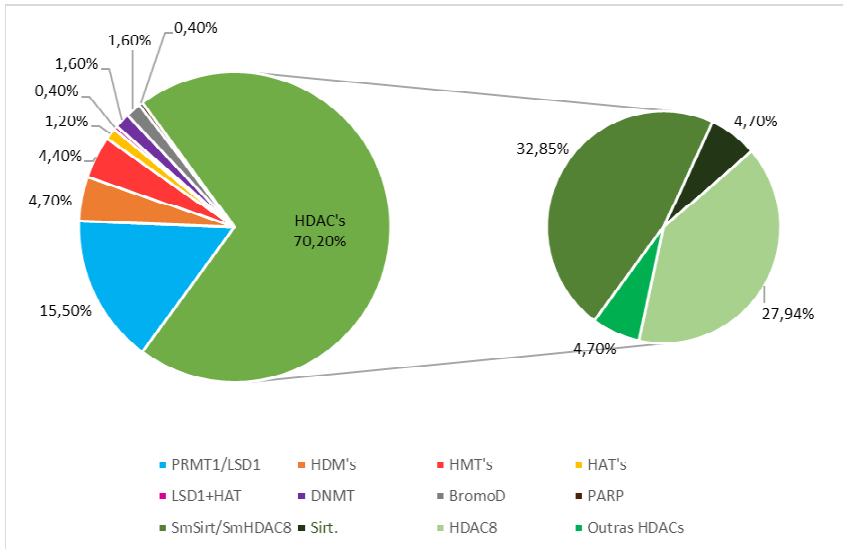
inibidores serem ativos em fêmeas do que em machos pode dever-se a essa diferença de expressão, já que algumas proteínas alvo dos inibidores podem ser mais expressas em fêmeas.

Esses resultados demonstram a necessidade de empregar distintos ensaios para triagem de drogas, pois assim é possível encontrar um maior número de hits do que quando os testes são realizados apenas com uma metodologia ou em somente uma fase do parasito. Além disso, comprova a importância da utilização da abordagem seletiva na busca de um novo fármaco, já que, para a validação da plataforma, foram utilizados inibidores de enzimas previamente validadas como potenciais alvos de drogas contra a esquistossomose, o que possibilitou direcionar o desenho de compostos específicos para essas proteínas.

5.3 Alvos e inibidores

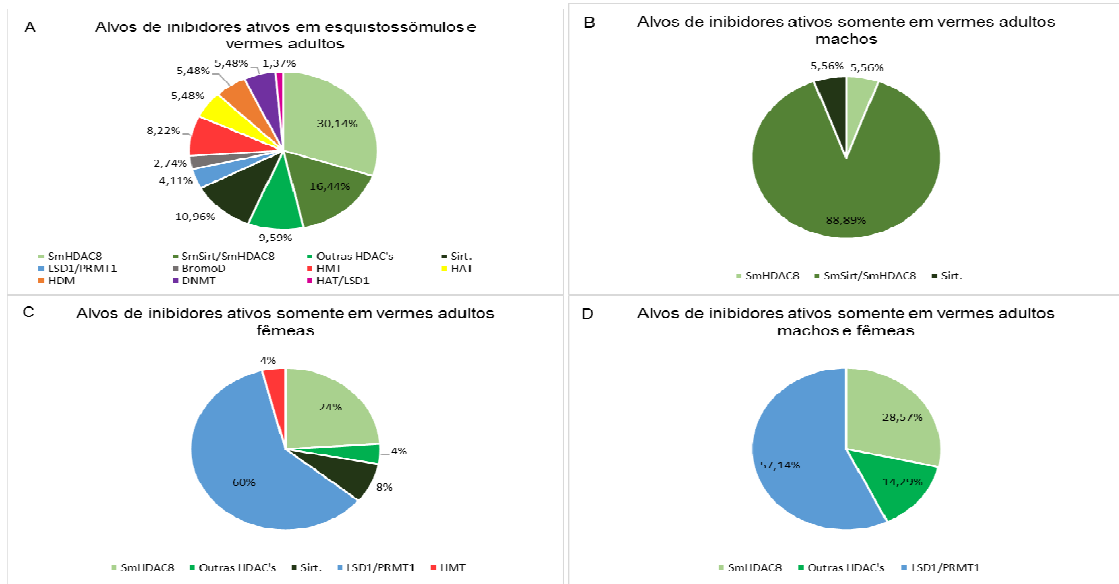
Dos 252 compostos testados, 177 foram desenvolvidos para histonas deacetilase (HDAC's), 39 para a metiltransferase 1 ou lisina demetilase 1 (PRMT1/LSD1), 12 para histonas demetilases (HDM's), 11 para metiltransferases (HMT's), 3 para histonas acetiltransferases (HAT's), 4 para metiltransferases do DNA (DNMT), 4 para Bromodomínios (BromoD), 1 para Proteínas Poly(ADP-ribose) polimerase (PARP) e 1 para LSD1/HAT (Gráfico 30).

Gráfico 30- Distribuição dos alvos para os quais os inibidores foram desenhados



O Gráfico representa a distribuição em porcentagem dos alvos específicos dos inibidores utilizados para a validação da plataforma de teste de drogas Anti-Schistosoma mansoni. O gráfico maior compreende as proteínas HDAC's (verde), PRMT1/LSD1 (azul), HDM's (laranja), HMT's (vermelho), HAT's (amarelo), PARP (marrom), DNMT's (roxo), BromoD (cinza) e LSD1/HAT (verde água). O gráfico menor compreende a família das Sirtuínas, SmSirtuin/SmHDAC8, somente SmHDAC8 e outras HDAC's não especificadas (verde escuro para verde claro) Fonte: Elaborado pela autora com dados fornecidos pelos colaboradores do A-ParaDDise.

Gráfico 31- Distribuição dos alvos dos inibidores ativos de acordo com a fase e sexo do *S. mansoni*



Os gráficos representam a distribuição em porcentagem dos alvos específicos dos inibidores ativos de acordo com a fase e sexo do verme adulto. O gráfico A representa os alvos de inibidores ativos em esquistossômulos e vermes adultos [SmHDAC8 (verde claro), PRMT1/LSD1 (azul), HDM's (laranja), HMT's (vermelho), HAT's (amarelo), DNMT's (roxo), BromoD (cinza), LSD1/HAT (verde água), outras HDAC's (rosa), Sirt (azul escuro) e SmSirt/SmHDAC8 (verde escuro)]. O gráfico B representa os alvos de inibidores ativos em vermes adultos machos [SmHDAC8 (verde claro), SmSirt/SmHDAC8 (verde escuro) e Sirt (azul escuro)]. O gráfico C representa os alvos de inibidores ativos em vermes adultos fêmeas [SmHDAC8 (verde claro), outras HDAC's (rosa), Sirt (azul escuro), LSD1/PRMT1 (azul claro) e HMT's (vermelho)]. O gráfico D representa os alvos de inibidores ativos em vermes adultos machos e fêmeas [SmHDAC8 (verde claro), outras HDAC's (rosa) e LSD1/PRMT1 (azul claro)]. Fonte: Elaborado pela autora com dados fornecidos pelos colaboradores do A-ParaDDise

A maioria dos inibidores ativos em pelo menos um teste em esquistossômulos e, em pelo menos um sexo de vermes adultos, foram desenvolvidos para inibirem histonas deacetilases, havendo a proporção de 1 inibidor ativo para 4 inibidores de HDAC testados nas duas fases do parasito. Todos os 4 inibidores de HAT's e DNMT's testados foram ativos em esquistossômulos e vermes adultos. Dentre os 18 compostos ativos somente em machos todos foram desenvolvidos para HDAC's, sendo a maior parte (16) desenvolvidos para SmSirt/SmHDAC8 (proporção de 5:1). Dentre os 25 compostos ativos somente em fêmeas, a maioria (15) foi desenvolvida para LSD1/PRMT1 (proporção de 3:1). Dentre os 7 compostos ativos somente em vermes adultos machos e fêmeas, a maioria (4) foi desenvolvida para LSD1/PRMT1 (proporção de 1:10) (Gráfico 31).

Conforme exposto anteriormente, 22 inibidores desenvolvidos para PRMT1/LSD1 demonstraram atividade anti-*Schistosoma mansoni* (sendo, 3 em ambas as fases, 15 ativos em vermes adultos fêmeas e 4 em ambos os sexos). Estudos recentes utilizando inibidores de PRMT1 em células cancerígenas demonstraram que a inibição dessa enzima bloqueou a proliferação dessas células, indicando a importância dessa proteína para o crescimento celular (XIE, 2014). Estudos em *S. mansoni*, utilizando inibidores de LSD1, foram realizados por Carneiro e colaboradores (2015), em que esquistossômulos expostos a 10-25 μM exibiram alta mortalidade após 48 horas de exposição, corroborando com os resultados encontrados nesse trabalho.

Estudos recentes, realizados por Carneiro e colaboradores (2015), demonstraram que inibidores de LSD1 influenciam a viabilidade de vermes adultos de *S. mansoni*. Nesse estudo, os vermes foram expostos a inibidores de LSD1 a 10-25 μM por 72 horas. Esses resultados corroboram com os nossos achados, evidenciando que LSD1 é um bom alvo para drogas contra a esquistossomose e que o composto BSF39 é um potencial inibidor dessa enzima, por ter sido ativo em todos os ensaios e fases do parasito.

Inúmeros estudos com inibidores de HDAC já relataram a importância dessas enzimas em células cancerígenas, a partir da indução de apoptose e inibição do crescimento (ADLER et al, 2008). Em *S. mansoni*, Dubois e colaboradores (2009) demonstraram que o inibidor de HDAC, TSA, induziu a hiperacetilação da histona H4

causando a apoptose de esquistossômulos *in vitro* a 2 μM . A maioria dos inibidores de HDAC da série MC induziu mortalidade de 100% a 10 μM e apresentou uma média de IC50 de 4,8, confirmando a eficácia de inibidores de HDAC em *S. mansoni*.

Inibidores de HDAC8 são muito estudados como alternativa terapêutica em células cancerígenas. Tang e colaboradores (2014) identificaram potentes inibidores capazes de inibir o crescimento de mieloma. A cada 3 inibidores desenvolvidos para SmHDAC8 testados em vermes adultos e esquistossômulos, um exibiu atividade em ambas as fases. Com esses dados não é possível afirmar que SmHDAC8 apresenta maior potencial como alvo de droga em relação a outra enzima, entretanto, possibilita concluir que a validação de uma proteína como alvo é de grande importância, pois SmHDAC8 vem sendo muito estudada como alvo de drogas anti-*Schistosoma mansoni* e já existem dados cristalográficos que possibilitaram o desenho de compostos específicos para a mesma (MAREK et al, 2013), o que pode ter sido o motivo do grande número de compostos ativos desenvolvidos para essa proteína.

Além disso, Marek e colaboradores (2013) demonstraram a importância da HDAC8 para a sobrevivência do *S. mansoni*. Nesse estudo, esquistossômulos foram silenciados por RNA de interferência para essa enzima e foram vistas alterações na motilidade do parasito e na indução de mortalidade. Também, esquistossômulos foram expostos ao inibidor de HDAC8, J1075, que provocou apoptose e mortalidade dos parasitos. Nossos resultados confirmam a importância da enzima HDAC8 para a sobrevivência do *S. mansoni*. Entretanto, ao contrário do que foi visto nos estudos realizados por Marek e colaboradores (2013), não houve indução de mortalidade nos esquistossômulos expostos ao inibidor J1075. Essa diferença pode ser devida ao tempo de exposição, cepa do parasito e concentração do inibidor, já que em nosso estudo os parasitos foram expostos por 48 horas a 10 e 20 μM e no trabalho de Marek e colaboradores (2013), o tempo de exposição, em que foi relatada mortalidade, foi de 96 horas nas concentrações de 50 e 100 μM .

Marek e colaboradores (2013) inocularam em camundongos esquistossômulos silenciados para HDAC8 por RNA de interferência e, após 35 dias de infecção, o número de vermes adultos recuperados foi 50% menor quando comparado ao grupo controle. Esse resultado demonstra que HDAC8 é importante

para o sucesso da infecção no hospedeiro e para o desenvolvimento e sobrevivência do *S. mansoni*. Os resultados do teste em vermes adultos com inibidores de SmHADAC8 das séries TH, TB e Kancera, ratificam a importância dessa enzima para o parasito.

Estudos utilizando o inibidor de proteínas com Bromodomínios, JQ1, são frequentemente realizados em células cancerígenas, demonstrando que esse inibidor interrompe o crescimento dessas células e induz apoptose, mesmo quando administradas em concentrações inferiores a 10 μM (LOCKWOOD, 2012). Nossos estudos em esquistossômulos e vermes adultos validaram a eficácia desse composto e a importância das proteínas com Bromodomínios em *S. mansoni*, uma vez que, a 10 μM , os inibidores JQ1 ($\text{IC}_{50} = 3,59/\text{IS} = 12,5$) e SGC-CBP3 (IC_{50} não determinado) induziram 100% de mortalidade em esquistossômulos.

Recentemente, Gajer e colaboradores (2015), realizaram um estudo com o inibidor de HAT, PU139, e seus resultados mostraram que células de neuroblastoma expostas a esse inibidor exibiram interrupção no crescimento. Carneiro e colaboradores (2014) adicionaram esse inibidor em cultura de vermes adultos e observaram que a 20 μM , PU139, não exibiu atividade sobre os vermes; entretanto, a 50 μM induziu a separação dos casais. Em nossos estudos, esse composto induziu redução da motilidade de vermes fêmeas expostas à concentração de 20 μM . Carneiro e colaboradores (2014) podem não ter observado alteração no movimento das fêmeas pois, as mesmas, quando acasaladas, permanecem no casal ginecóforo, impossibilitando a observação de ausência de movimento, confirmando a importância de realizar um ensaio de análise de movimento em vermes desacasalados.

Estudos realizados com o inibidor de HAT e LSD1, Curcumin, relataram a mortalidade de células cancerígenas expostas a esse composto (CHOI, PARK, 2015). Magalhães e colaboradores (2009) demonstraram a eficácia desse composto no *S. mansoni*. Nesse estudo, foi visto que esse composto, nas concentrações de 5 e 20 μM , diminuiu a viabilidade dos vermes adultos e reduziu em 50% a ovoposição. Ainda, nas concentrações de 50 e 100 μM , causou a mortalidade de 100% dos vermes. Esses dados corroboram os resultados apresentados nesse trabalho, em que esse composto reduziu 95,5% do movimento das fêmeas a 20 μM , confirmando a importância de HAT e LSD1 para o desenvolvimento do *S. mansoni*.

Neste trabalho, foram identificados 9 (Tabela 2) potenciais drogas anti-Schistosoma mansoni, que apresentaram atividade em esquistossômulos e em vermes adultos machos e fêmeas, além de um bom IS e/ou um IC50 < ou = ao da droga de escolha disponível para o tratamento da esquistossomose, Praziquantel. É importante frisar que há necessidade de vários testes ADMET para validação dos mesmos: teste de biodisponibilidade, estabilidade, absorção, metabolismo, distribuição, excreção/toxicidade em farmacocinética e testes in vivo .

Tabela 2 – Potenciais drogas anti-Schistosoma mansoni selecionadas

Inibidor	Alvo	IC50	Índice de seletividade
JQ1	BromoD	3,1915	12,533
MC3031	HDAC	1,7434	2,8679
MC2141	Sirt1/2	2,2339	-
MC2908	HMT	0,3448	28,998
MC3668	DNMT	<0,625	-
MC2705	DNMT	<0,625	-
MC3073	HDM	1,1259	-
C-646	HAT	2,02	-
SPV-106	HAT	2,2885	30,982

Fonte: Elaborada pela autora com resultados do trabalho.

6 CONCLUSÃO

Para o estabelecimento da plataforma de teste de drogas anti-*Schistosoma mansoni*, foram selecionadas as metodologias de ensaio visual por coloração com iodeto de propídio e a análise quantitativa de lactato no meio de cultivo, para os testes em esquistossômulos; e a análise de movimento em vermes adultos a partir do software WormAssay.

O ensaio visual por coloração com iodeto de propídio e a análise quantitativa do lactato demonstraram ser metodologias eficientes e sensíveis, capazes de fornecer resultados confiáveis para a triagem de drogas em esquistossômulos. Entretanto, esses métodos devem ser realizados paralelamente, uma vez que os mesmos são complementares e parasitos vivos, porém inviáveis, não se coram pelo iodeto de propídio, mas excretam pouco lactato no meio.

O ensaio em vermes adultos utilizando o software de análise de movimento WormAssay confirmou ser um ensaio de alto rendimento e de alta sensibilidade. Para esse ensaio os parasitos devem ser analisados desacasalados, uma vez que a suscetibilidade ao fármaco pode ser influenciada pelo sexo do verme.

A triagem de fármacos desenvolvidos especificamente para alvos previamente validados demonstrou ser essencial para uma busca eficaz de potenciais drogas.

Os inibidores JQ1, MC3031, MC2141, MC2908, MC3668, MC2705, MC3073, C-646 e SPV-106 são potenciais drogas para auxiliarem no tratamento da esquistossomose, pois foram ativos em esquistossômulos e vermes adultos machos e fêmeas e exibiram baixos valores de IC₅₀ e/ou altos IS para o parasito, quando testados em células de fibroblasto de camundongos.

Os fatores de modificação epigenética parecem ser essenciais para a sobrevivência do *S. mansoni*, podendo levar à diminuição da viabilidade do parasito e também à indução de mortalidade do mesmo.

A enzima LSD1/KDM1 parece ter grande importância no desenvolvimento do parasito adulto quando comparada aos esquistossômulos, confirmando o potencial dessas enzimas como alvos para o desenvolvimento de drogas para o tratamento da esquistossomose.

7 PERSPECTIVAS

- Analisar a quantidade de lactato presente no meio de esquistossômulos expostos aos inibidores ainda não analisados nessa metodologia;
- Estabelecer a leitura de acidificação de meio contendo fenol red como método alternativo;
- Estabelecer o uso da droga Mefloquina como controle positivo nos testes em esquistossômulos;
- Estabelecer o uso do Praziquantel como controle positivo nos testes em vermes adultos.
- Adaptar para o uso do método de análise de movimento WormAssay em esquistossômulos;
- Determinar o IC50 e o IS de todos os compostos ativos;
- Direcionar os compostos ativos para testes ADMET e *in vivo*.

REFERÊNCIAS

- 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 Neglected Tropical Disease*, San Francisco, v. 3. N. 7, p. 1-14, jul. 2009
- ADLER, J. T; HOTTINGER, D. G; KUNNIMALAIYAAN, M; CHEN, H. Histone deacetylase inhibitors upregulate Notch-1 and inhibit growth in pheochromocytoma cells. *Surgery, Wis*, v. 144, n. 6, p. 956-961, dez. 2008.
- ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J, RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap 4, p. 210 -230.
- ANDERSON, L; AMARAL, M. S; BECKEDORFF, F; SILVA, L. F; DAZZANI, B; OLIVEIRA, K. C; ALMEIDA, G. T; GOMES, M. R; PIRES, D. S.; SETUBAL, J. C; DEMARCO, R; VERJOVSKI-ALMEIDA, S. *Schistosoma mansoni* Egg, Adult Male and Female Comparative Gene Expression Analysis and Identification of Novel Genes by RNA-Seq. *Plos Neglected Tropical Disease*, São Paulo, v. 9, n. 12, dez. 2015.
- AZZI, A.; COSSEAU, C.; GRUNAU, C. *Schistosoma mansoni*: developmental arrest of miracidia treated with histone deacetylase inhibitors. *Experimental parasitology*, Perpignan, v. 121, p. 288 – 291, dez. 2008
- BALASUBRAMANYAM, K; VARIER, R. A; ALTAF, M; SWAMINATHAN, V; SIDDAPPA, N. B; RANGA, U; KUNDU, T; K. Curcumin, a novel p300/CREB-binding protein-specific inhibitor of acetyltransferase, represses the acetylation of histone/nonhistone proteins and histone acetyltransferase-dependent chromatin transcription. *The journal of biological chemistry*, Jakkur, v. 279, n. 49, p. 51163-51171, dez. 2004.
- BECKER, B; MEHLHORN, H; ANDREWS, P; THOMAS, H; ECKERT, J. Light and Electron Microscopic Studies on the Effect of Praziquantel on *Schistosoma mansoni*, *Dicrocoelium dendriticum*, and *Fasciola hepatica* (Trematoda) in vitro. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, Düsseldorf, v. 63, p. 113-128, 1980.
- BERGER, S.L. Histone modifications in transcriptional regulation. *Current opinion in genetics & development*, Philadelphia, v.12, n. 2, p. 142 – 148, abr. 2002.
- BIRD, A. Perceptions of epigenetics. *Nature*, Edinburgh, v.447, n.7143, p.396-398, mai. 2007
- BISSINGER, E. M; HEINKE, R; SPANNHOFF, A; EBERLIN, A; METZGER, E; CURA, V; HASSENBOEHLER, P; CAVARELLI, J; SCHÜLE, R; BEDFORD, M. T; SIPPL, W; JUNG, M. Acyl derivatives of p-aminosulfonamides and dapsone as new

inhibitors of the arginine methyltransferase hPRMT1. *Bioorganic & medicine chemistry*, Freiburg, v. 19, n. 12, p. 3717-3731, jun. 2011.

BOWLING, T. Application of a resazurin-based high-throughput screening assay for the identification and progression of new treatments for human African trypanosomiasis. *The International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance*, Geneva, v. 2, p. 262-270, mar. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Doenças infecciosas e parasitárias - Guia de bolso*. Brasília, DF, 2010. 450 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Vigilância da esquistossomose mansoni diretrizes técnicas*. Brasília, DF, 2014. 146 p.

BRUCE, J. I.; DIAS, L. C.; LIANG, Y. S.; COLES, G. C. Drug resistance in schistosomiasis: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 82, n. 4, p. 143-150, 1987.

CARNEIRO, V. C.; ABREU, I. C. S.; TORRES, E. J.; CABY, S.; LANCELOT, J.; VANDERSTRAETE, M.; FURDAS, S. D.; JUNG, M.; PIERCE, R. J.; FANTAPPIÉ, M. R. Epigenetic changes modulate schistosome egg formation and are a novel target for reducing transmission of schistosomiasis. *Plos pathogens*, v. 10, n. 8, maio 2014.

CARNEIRO, V. C.; ABREU, I. C. S.; GONÇALVES, B. M.; MONTEIRO, P. H. S.; GANESAN, A.; VERJOVSKI, S.; AMARAL, M. S.; BORRELLO, T.; PIERCE, R. J.; FANTAPPIÉ, M. R. Targeting epigenetic regulators to control schistosomiasis. In: *Anais do 23 rd Congress of the International Union for Biochemistry and Molecular Biology*, 2015. Foz do Iguaçu, Brasil. Disponível em : < <http://www.sbbq.org.br/iubmb2015/cdrom/resumos/R10184-1.pdf>>. Acesso em: 20 dez. 2015.

CARVALHO, O. S.; COELHO, P. M. Z.; LENZI, H. L. L. *Schistosoma mansoni e Esquistossomose: uma visão multidisciplinar*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. 1123 p. ISBN 978-857541-150-6

CAVALCANTE, A. G. M.; BRUIN, P. F. C. O papel do estresse oxidativo na DPOC: conceitos atuais e perspectivas. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v.35, p.1227-1237, 2009.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; BASSO, A.; GUIDI, A. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Molecular and Biochemical Parasitology*, Rome, v. 195, n. 1, p. 23-29, jun. 2014.

CHOI, T. E.; PARK, E. Curcumin enhances poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor sensitivity to chemotherapy in breast cancer cells. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, Boston, v. 26, n. 12, p. 1442-1447, ago. 2015.

CUNHA, A. S.; PEDROSA, R. C. Double-blind therapeutical evaluation based on the quantitative oogram technique, comparing praziquantel and oxamniquine in human

schistosomiasis mansoni. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo*, v. 28, n. 5, p. 337-351, set.-out. 1986.

DE LA CRUZ, X; LOIS, S; SÁNCHEZ-MOLINA, S; MARTÍNEZ-BALBÁS, M. A. Do protein motifs read the histone code? *BioEssays, Barcelona*, v. 27, n. 2, p. 164–175, 2005.

DOENHOFF, M. J.; CIOLLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases, Nottingham*, v. 21, p. 659–667, 2008.

DOENHOFF, M. J.; FALLON, P. G. Drug-resistant schistosomiasis: resistance to praziquantel and oxamniquine induced in *Schistosoma mansoni* in mice is drug specific. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 51, n. 1, p. 83-88, jul. 1994.

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*. *Molecular and biochemical parasitology, Lille*, v.168, p. 7-15, jun. 2009.

DUVIC, M; TALPUR, R; NI, X; ZHANG, C; HAZARIKA, P; KELLY, C; CHIAO, J. H; REILLY, J. F; RICKER, J. L; RICHON, V. M; FRANKEL, S. R. Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). *Blood, Houston*, v. 109, n. 1, p. 31 – 39, set. 2006.

ENGELS, D; ENGELS, D; CHITSULO, L; MONTRESOR, A; SAVIOLI, L. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta Tropica, Geneva*, v. 82, p. 139-146, 2002.

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

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, Massachusetts*, v. 5, n. 5, maio. 2010.

GAJER, J. M; FURDAS, S. D; GRÜNDER, A; GOTHWAL, M; HEINICKE, U; KELLER, K; COLLAND, F; FULDA, S; PAHL, H. L; FICHTNER, I; SIPPL, W; JUNG, M. Histone acetyltransferase inhibitors block neuroblastoma cell growth in vivo. *Oncogenesis, Freiburg*, v. 4, fev. 2015.

GREENBERG, R. M. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes. *Parasitology*, v. 140, n. 12, p. 1534-1546, out. 2013.

GRYSEELS, B; POLMAN, K; CLERINX, J; KESTENS, L. Human schistosomiasis. *Lancet, Antwerp*, v.388, n.9542, p.1106-1118, set. 2006.

HÄRTER, G; FRICKMANN, H; ZENK, S; WICHMANN, D; AMMANN, B; KERN, P; FLEISCHER, B; TANNICH, E; POPPERT, S. Diagnosis of neuroschistosomiasis by antibody specificity index and semi-quantitative real-time PCR from cerebrospinal fluid and serum. *Journal of Medical Microbiology*, Hamburg, v. 63, n. 2, p. 309-312, fev. 2014.

HERCEG, Z; WANG, Z. Q. Functions of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) in DNA repair, genomic integrity and cell death. *Mutation research*, Lyon, v. 477, p. 97-110, jun. 2001.

HOWE, S.; ZÖPHEL, D.; SUBBARAMAN, H.; UNGER, C.; HELD, J.; ENGLEITNER, T; HOFFMANN, W. H.; KREIDENWEISS, A. Lactate as a novel quantitative measure of viability in *Schistosoma mansoni* drug sensitivity assays. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Tübingen, v. 59, n. 2, p. 1193-1199, fev. 2015.

JASENCAKOVA, Z; SOPPE, W. J; MEISTER, A; GERNAND, D; TURNER, B. M; SCHUBERT, I. Histone modifications in Arabidopsis- high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *The plant journal*, Gatersleben, v. 33, n. 3, p. 471-480, fev. 2003.

JOIRDANE, J; SOUTHGATE, V. R; PAGÈS, J. R; DURAND, P; TCHUEM TCHUENTÉ, L. A. Recent Studies on *Schistosoma intercalatum*: Taxonomic Status, Puzzling Distribution and Transmission Foci Revisited. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 96, p. 45-48, jul. 2001.

KATZ, N; ALMEIDA, K. Esquistossomose, xistosa, barriga d'água. *Ciência e Cultura*, São Paulo, v.55, n.1, p. 38-41, mar. 2003.

KATZ, N; COUTO, F. F. B; ARAÚJO, N. Imatinib activity on *Schistosoma mansoni*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Belo Horizonte, v. 108, n. 7, p. 850-853, nov. 2013.

KEISER, J. In vitro and in vivo trematode models for chemotherapeutic studies. *Parasitology*, Basel, v. 137, n. 3, p. 589-603, mar. 2010.

KING, C. H.; DANGERFIELD-CHA, M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Cronic Illness*, Ohio, v. 4, n. 1, p. 65-69, mar. 2008.

KOLAROVÁ, L; HORÁK, P; SKÍRNISSON, K; MAREČKOVÁ, H; DOENHOFF, M. Cercarial Dermatitis, a Neglected Allergic Disease. *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, Prague, v.45, n. 1, p. 63-74, ago. 2013.

KOTZE, A. C; CLIFFORD, S; O'GRADY, J; BEHNKE, J. M; MCCARTHY, J. S. An in vitro larval motility assay to determine anthelmintic sensitivity for human hookworm and *Strongyloides* species. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, Queensland, v. 71, n. 5, p. 608-616, nov. 2004.

KOUZARIDES, Tony. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell*, Cambridge, v. 128, p. 693-705, fev. 2007.

- KRAUTZ-PETERSON, G; SIMOES, M; FAGHIRI, Z; NDEGWA, D; OLIVEIRA, G; SHOEMAKER, C. B; SKELLY, P. J. Suppressing glucose transporter gene expression in schistosomes impairs parasite feeding and decreases survival in the mammalian host. *Plos pathogens, Massachusetts*, v. 6, n. 6, jun. 2010.
- KUHN, I; KELLENBERGER, E; SAID-HASSANE, F; VILLA, P; ROGNAN, D; LOBSTEIN, A; HAIECH, J; HIBERT, M; SCHUBER, F; MULLER-STEFFNER, H. Identification by high-throughput screening of inhibitors of *Schistosoma mansoni* NAD(+) catabolizing enzyme. *Bioorganic & Medicinal Chemistry, Ilkirch*, v. 18, n. 22, p. 7900-7910, no. 2010.
- LAMBERTUCCI, J. R. et al. A esquistossomose mansoni em Minas gerais. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Belo Horizonte*, v. 20, n.1, p. 47-52, jan/mar. 1987.
- LANCELOT, J; CABY, S; DUBOIS-ABDESSELEM, F; VANDERSTRAETE, M; TROLET, J; OLIVEIRA, G; BRACHER, F; JUNG, M; PIERCE, R. J. *Schistosoma mansoni* Sirtuins: characterization and potential as chemotherapeutic targets. *Plos Neglected Tropical Disease, Lille*, v. 7, n. 9, set. 2013.
- LI, T; ZINIEL, P. D; HE, P. Q; KOMMER, V. P; CROWTHER, G. J; HE, M; LIU, Q; VAN VOORHIS, W. C; WILLIAMS, D. L; WANG, M. W. High-throughput screening against thioredoxin glutathione reductase identifies novel inhibitors with potential therapeutic value for schistosomiasis. *Infectious Diseases of Poverty, Shanghai*, v. 4, n. 40, ago. 2015.
- LOCKWOOD, W. W; ZEJNULLAHU, K; BRADNER, J. E; VARMUS, H. Sensitivity of human lung adenocarcinoma cell lines to targeted inhibition of BET epigenetic signaling proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences, Bethesda*, v. 109, n. 47, p. 19408-19413, nov. 2012.
- 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. *Parasitology Research, São Paulo*, v. 104, n. 5, p. 1197-1201, dez. 2009.
- MANSOUR, N. R.; BICKLE, Q. D. Comparison of microscopy and Alamar blue reduction in a larval based assay for schistosome drug screening. *Plos Neglected Tropical Diseases, London*, v. 4, n. 8, ago. 2010.
- MARCELLINO, C.; GUT, J.; LIM, K. C.; SINGH, R.; MCKERROW, J.; SAKANARI, J. WormAssay: A Novel Computer Application for Whole-Plate Motion-based Screening of Macroscopic Parasites. *Plos Neglected Tropical Diseases, San Francisco*, v. 6, n. 1, jan. 2012.
- MAREK, M; KANNAN, S; HAUSER, A. T; MOURÃO, M. M; CABY, S; CURA, V; STOLFA, D. A; SCHMIDTKUNZ, K; LANCELOT, J; ANDRADE, L; RENAUD, J. P; OLIVEIRA, G; SIPPL, W; JUNG, M; CAVARELLI, J; PIERCE, R. J; ROMIER, C. Structural basis for the inhibition of histone deacetylase 8 (HDAC8), a key epigenetic

player in the blood fluke *Schistosoma mansoni*. *Plos Pathogens*, Illkirch, v. 9, n.9, set. 2013.

MASSIE, C. E; LYNCH, A; RAMOS-MONTOYA, A, BOREN, J; STARK, R; FAZLI, L; WARREN, A; SCOTT, H; MADHU, B; SHARMA, N; BON, H; ZECCHINI, V; SMITH, D-M; DENICOLA, G. M; MATHEWS, N; OSBORNE, M; HADFIELD, J; MACARTHUR, S; ADRYAN, B; LYONS, S. K; BRINDLE, K. M; GRIFFITHS, J; GLEAVE, M. E; RENNIE, P.S; NEAL, D. E; MILLS, I. G. The androgen receptor fuels prostate cancer by regulating central metabolism and biosynthesis. *The EMBO Journal*, Cambridge, v. 30, n. 13, p. 2719-2733, maio. 2011;

MATOS, P; HORN, J. A; BEARDS, F; LUI, S; DESFORGES, M; HARRIS, L.K. A role for the mitochondrial-associated protein p32 in regulation of trophoblast proliferation. *Molecular human reproduction*, Manchester, v. 20, n.1, p. 745-755, ago. 2014.

MELO, A. G. S. Epidemiologia da esquistossomose e conhecimento da população em área periurbana de Sergipe. Dissertação (Mestrado) – Universidade Tiradentes, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente, Aracaju. 2011.

MENDITI, K. B. C; KANG, H.C. O Papel das Proteínas Histonas nas Neoplasias Hematológicas. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Niterói, v.53, n.4, p.453-460, abr. 2007 134

MENSCHIKOWSKI, M; HAGELGANS, A; NACKE, B; JANDECK, C, SUKOCHEVA, O; SIEGERT, G. Epigenetic control of phospholipase A2 receptor expression in mammary cancer cells. *BMC Cancer*, Fetscherstr, v. 16, n. 1, p. 971, dez. 2015.

MOURÃO, M. M, DINGUIRARD, N; FRANCO, G, R; YOSHINO, T. P. Role of the endogenous antioxidant system in the protection of *Schistosoma mansoni* primary sporocysts against exogenous oxidative stress. *Plos Neglected tropical disease*, Belo Horizonte, v. 3, n. 11, nov. 2009.

NEVES, D.P; MELO, A. N; LINARDI, P. M; VITOR, R. W. A. *Parasitologia Humana*. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. Cap. 22, p. 193-212.

NEVES, J; RASO, P. Estudo anátomo-clínico de um caso de forma toxêmica da esquistossomose mansoni que evoluiu para a forma hepato-esplênica em 130 dias (Fibrose Symmers). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, São Paulo, v. 7, p. 256-266, 1965.

NEW, M.;BOLZSCHA, H.;THANGUE, N. B. HDAC inhibitor-based therapies: Can we interpret the code? *Molecular Oecology*, Oxford, v. 6, p.637-656, out. 2012.

NTRANOS, A; CASACCIA, P. Bromodomains: Translating the words of lysine acetylation into myelin injury and repair. *Neurosciences letter*, New York, v. 15, p. 30178-30186, out. 2015.

OHMAE, H; SINUON, M; KIRINOKI, M; MATSUMOTO, J; CHIGUSA, Y; SOCHEAT, D; MATSUDA, H. Schistosomiasis mekongi: from discovery to control. *Parasitology International*, Ibaraki, v. 53, n. 2, p. 135-142, jun. 2004.

OUAISSI, M; OUAISSI, A. Histone Deacetylase Enzymes as Potential Drug Targets in Cancer and Parasitic Diseases. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, Marsellie, v. 2006, n. 2, p. 13474, 2006.

PARISE FILHO, R.; SILVEIRA, M. A. B. Panorama atual da esquistossomíase no mundo. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, São Paulo, v. 37, n. 2, p. 123-135, mai/ago. 2001.

PAVELEY, R. A; MANSOUR, N. R; HALLYBURTON, I; BLEICHER, L. S; BENN, A. E; MIKIC, I; GUIDI, A; GILBERT, I. H; HOPKINS, A. L; BICKLE, Q. D. Whole organism high-content screening by label-free, image-based Bayesian classification for parasitic diseases. *Plos Neglected Tropical Diseases*, London, v. 6, n. 7, jul. 2012.

PEAK, E.; CHALMERS, I. W.; HOFFMANN, K. F. Development and validation of a quantitative, high-throughput, fluorescent-based bioassay to detect *Schistosoma* viability. *Plos Neglected Tropical Diseases*, Aberystwyth, v. 4, n. 7, jul. 2010.

PELLEGRINO, J; KATZ, N. Experimental chemotherapy of *Schistosomiasis mansoni*. *Advances in parasitology*, Belo Horizonte, v. 6, p. 233-290, 1968.

PICA-MATTOCCIA, L; CIOLI, D. Sex- and stage-related sensitivity of *Schistosoma mansoni* to in vivo and in vitro praziquantel treatment. *International Journal for Parasitology*, Rome, v. 34, n. 4, p. 527-533, maar. 2004.

PIERCE, R. J; DUBOIS-ABDESSELEM, F; LANCELOT, J; ANDRADE, L; OLIVEIRA, G. Targeting Schistosome Histone Modifying Enzymes for Drug Development. *Current Pharmaceutical Design*, Lille, v. 18, n. 00, p. 1 -12, 2012.

RINALDI, G; LOUKAS, A; BRINDLEY, P. J; IRELAN, J. T; SMOUT, M. J. Viability of developmental stages of *Schistosoma mansoni* quantified with xCELLigence worm real-time motility assay (xWORM). *International Journal for Parasitology*, Washington, v. 5, n. 3, p. 141-148, ago. 2015

ROKNI, M. B. *Schistosomiasis*. Rijeka: InTech, 2012. 310 p. ISBN 978-953-307-852-6.

RUIJTER, A. J. M. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochemical Society*, Amsterdam, v. 370, p. 737 – 749, 2003.

SCHIEDEL, M; MAREK, M; LANCELOT, J; KARAMAN, B; ALMLÖF, I; SCHULTZ, J; SIPPL, W; PIERCE, R. J; ROMIER, C; JUNG, M. Fluorescence-based screening assays for the NAD⁺-dependent histone deacetylase smSirt2 from *Schistosoma mansoni*. *Journal of Biomolecular Screening*, Freiburg, v. 20, n. 1, p. 112-121, jan. 2015.

SHIMONY, O.; JAFFE, C. L. Rapid fluorescent assay for screening drugs on *Leishmania amastigotes*. *Journal of microbiological methods*, Jerusalem, v. 75, n. 2, p. 196-200, out. 2008.

SILVA, M. P.; OLIVEIRA, G. L.; DE CARVALHO, R. B.; DE SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M.; PINTO, P. L.; DE MORAES, J. Antischistosomal activity of the terpene nerolidol. *Molecules*, Guarulhos, v. 19, n. 3, p. 3793-3803, mar. 2014.

SILVEIRA, A. C. Controle da esquistossomose no Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 84, n. 1, p. 91-104, out. 1989.

SMOUT, M. J.; KOTZE, A. C.; MCCARTHY, J. S.; LOUKAS, A. A novel high throughput assay for anthelmintic drug screening and resistance diagnosis by real-time monitoring of parasite motility. *Plos Neglected Tropical Diseases*, Cairns, v. 4, n. 11, nov. 2010.

STIMSON, L.; ROWLANDS, M. G.; NEWBATT, Y. M.; SMITH, N. F.; RAYNAUD, F. I.; ROGERS, P.; BAVETSIAS, V.; GORSUCH, S.; JARMAN, M.; BANNISTER, A.; KOUZARIDES, T.; MCDONALD, E.; WORKMAN, P.; AHERNE, G. W. Isothiazolones as inhibitors of PCAF and p300 histone acetyltransferase activity. *Molecular cancer therapeutics*, Surrey, v. 4, n. 10, p. 1521-1532, out. 2005.

STOREY, B.; MARCELLINO, C.; MILLER, M.; MACLEAN, M.; MOSTAFA, E.; HOWELL, S.; SAKANARI, J.; WOLSTENHOLME, A.; KAPLAN, R. Utilization of computer processed high definition video imaging for measuring motility of microscopic nematode stages on a quantitative scale: "The Worminator". *The International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance*, San Francisco, v. 4, n. 3, p. 233-243, ago. 2014.

TANG, G.; WONG, J. C.; ZHANG, W.; WANG, Z.; ZHANG, N.; PENG, Z.; ZHANG, Z.; RONG, Y.; LI, S.; ZHANG, M.; YU, L.; FENG, T.; ZHANG, X.; WU, X.; WU, J. Z.; CHEN, L. Identification of a Novel Aminotetralin Class of HDAC6 and HDAC8 Selective Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, Shanghai, v. 57, n. 19, p. 8026-8034, set. 2014.

THÉTIOT-LAURENT, S. A.; BOISSIER, J.; ROBERT, A.; MEUNIER, B. Schistosomiasis chemotherapy. *Angewandte Chemie International Edition*, Weinheim, v. 52, n.31, p. 7936-7956, jul. 2013

TRITTEN, L.; SILBEREISEN, A.; KEISER, J. Nitazoxanide: In vitro and in vivo drug effects against *Trichuris muris* and *Ancylostoma ceylanicum*, alone or in combination. *The International Journal for Parasitology – Drugs and Drug Resistance*, Basel, v. 2, p. 98-105, mar. 2012.

WANG, J.; LU, F.; REN, Q.; SUN, H.; XU, Z.; LAN, R.; LIU, Y.; WARD, D.; QUAN, J.; YE, T.; ZHANG, H. Novel histone demethylase LSD1 inhibitors selectively target cancer cells with pluripotent stem cell properties. *Cancer research*, Shenzhen, v. 71, n. 23, p. 7238-7249, dez. 2011.

WANG, H; 1, LIU, W; BLACK, S; TURNER, O; DANIEL, J. M; DEAN-COLOMB, W; HE, Q. P; DAVIS, M; YATES, C. Kaiso, a transcriptional repressor, promotes cell migration and invasion of prostate cancer cells through regulation of miR-31 expression. *Oncotarget*, Tuskegee, dez. 2015.

WEERAKOON, K. G. A. D. Advances in the Diagnosis of Human Schistosomiasis. *Clinical Microbiology Reviews*, Brisbane, v.28, n. 4, p. 939-967, out. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Prevention and control of schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis. WHO technical report series, Geneva, 2002.

Disponível em:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/42588/1/WHO_TRS_912.pdf> . Acesso em: 15 out. 2015.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis. *Weekly epidemiological Record*, Geneva, n. 9, p. 73-80, fev. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Schistosomiasis fact sheet 115. Net, Geneva, mai. 2015. Media Centre. Disponível em:

<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 15 out. 2015.

XIE, Y; ZHOU, R; LIAN, F; LIU, Y; CHEN, L; SHI, Z; ZHANG, N; ZHENG, M; SHEN, B; JIANG, H; LIANG, Z; LUO, C. Virtual screening and biological evaluation of novel small molecular inhibitors against protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1). *Organic & Biomolecular Chemistry*, v. 12, p. 9665-9673, out. 2014.

YAO, W; YUE, P; KHURI, F. R; SUN, S. The BET bromodomain inhibitor, JQ1, facilitates c-FLIP degradation and enhances TRAIL-induced apoptosis independent of BRD4 and c-Myc inhibition. *Oncotarget*, Hunan, v. n. 33, p. 34669-34679, out. 2015.

YOUSIF, F; WASSEL, G; BOULOS, L; LABIB, T; MAHMOUD, K; EL-HALLOUTY, S; EL BARDICY, S; MAHMOUD, S; RAMZY, F; GOHAR, L; EL-MANAWATY, M; EL GENDY MA; FAYAD, W; EL-MENSHAWI, B. Contribution to in vitro screening of Egyptian plants for schistosomicidal activity. *Pharmaceutical Biology*, Imbaba, v. 50, n. 6, p. 732-739, jun. 2012.