

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

MATHEUS SIQUEIRA SILVA

**ANÁLISE DE ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA 7-EPICLUSIANONA
UTILIZANDO FERRAMENTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES**

ALFENAS – MG

2016

MATHEUS SIQUEIRA SILVA

**ANÁLISE DE ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA 7-EPICLUSIANONA
UTILIZANDO FERRAMENTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES**

Dissertação, requisito parcial, para obtenção do título de mestre, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, UNIFAL-MG. Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos. Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

ALFENAS – MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Silva, Matheus Siqueira.

Análise de atividade esquistossomocida da 7-epiclusianova utilizando ferramentas bioquímicas e moleculares / Matheus Siqueira Silva. – Alfenas - MG, 2016.

81 f.

Orientador: Marcos José Marques.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, 2016.

Bibliografia.

1. Schistosoma mansoni. 2. Benzofenonas. 3. Superóxido Dismutase. 4. Reação em Cadeia da Polimerase. 5. Simulação de Acoplamento Molecular. I. Marques, Marcos José. II. Título.

CDD-616.963

MATHEUS SIQUEIRA SILVA

**ANÁLISE DE ATIVIDADE ESQUISTOSSOMICIDA DA 7-EPICLUSIANONA
UTILIZANDO FERRAMENTAS BIOQUÍMICAS E MOLECULARES**

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de Concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.
Orientador: Prof. Dr. Marcos José Marques

Aprovado em: 24/02/16

Prof. Dr. Marcos José Marques

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Profa. Dra. Fernanda Ramos Gadelha

Instituição: Universidade Federal de Juiz de Fora

Assinatura: 

Profa. Dra. Lívia de Figueiredo Diniz Castro

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Assinatura: 

Dedico a Deus, aos meus pais a conclusão
deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Marcos José Marques, meu orientador, conselheiro, exemplo e principalmente amigo, por ter acreditado no meu potencial desde o início deste trabalho, por ter convertido a minha imaturidade em experiência e por ter me ensinado a trilhar os passos da carreira acadêmica. Obrigado.

À doutoranda Aline Pereira Castro, por ter me indicado no processo seletivo ao Prof. Dr. Marcos e por toda a ajuda desempenhada durante a elaboração, execução e conclusão desse projeto.

Ao Dr. Fábio Antônio pelos ensinamentos, correções, sugestões e principalmente pela amizade.

A Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG) por toda a experiência fornecida.

As instituições de fomento FAPEMIG, FINEP, CNPq e CAPES, que possibilitaram a execução do trabalho.

À Prof. Danielle Dias pela disposição e pelos conhecimentos passados.

Ao grupo do Laboratório de Biologia Molecular pela infraestrutura e equipamentos disponíveis, e pelos amigos Daniela, Josidel, Joana, Juliana, Isabella, Patrícia, e Rayssa, por todos os lanches e momentos de descontração.

À companheira de trabalho e mestra Andreísa Teixeira de Castro, por toda a ajuda e ensinamentos.

Aos meus pais Gabriel e Zélia, que se fizeram presentes desde o começo desta conquista. Sem vocês, eu não teria chegado até aqui.

Ao Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ pelo suporte técnico e científico que proporcionou para realização deste trabalho.

RESUMO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada, com alta morbidade e mortalidade, que afeta atualmente mais de 200 milhões de pessoas em todo o mundo, tendo o praziquantel (PZQ) como única opção de tratamento. Estudos descrevem várias cepas do parasito que são resistentes ao PZQ, fazendo-se necessário, estudos de novos medicamentos que possam ser utilizados no tratamento da esquistossomose. Um dos princípios do planejamento racional de fármacos consiste na escolha de alvos onde a droga produza efeito tóxico seletivo ao patógeno, e para isso é necessário definir o mecanismo de ação do fármaco proposto. A 7-epiclusianona (7-epi) é uma benzofenona que já teve atividade esquistossomicida descrita, tendo como critérios de eficácia a motilidade, danos no tegumento, acasalamento, postura de ovos, movimentação do sistema digestório e excretor. Neste sentido, o presente estudo analisou o impacto da 7-epi nos mecanismos de proteção dos vermes adultos de *S. mansoni* com o auxílio de ferramentas bioquímicas e biomoleculares. Uma investigação do grau de estresse oxidativo pela titulação de malondialdeído mostrou que a 7-epi na concentração de 12,5 µg/mL possui uma taxa de peroxidação lipídica no parasito reduzida quando comparada ao controle Kolliphor[®], mas aumentada na concentração de 50 µg/mL ($p < 0,001$). De modo similar, quando se investigou a atividade no contexto *ex vivo* da superóxido dismutase (SOD), uma importante enzima detoxificadora do parasito, foi possível visualizar que a 7-epi interfere na sua atividade de forma significativa em relação aos controles RPMI 1640 e Kolliphor[®] à partir da concentração de 12,5 µg/mL ($p < 0,001$). Essa dosagem corresponde a 30% de inibição da atividade enzimática total em relação ao Kolliphor[®] e está muito próxima da dosagem de 7-epi que matou 90% dos parasitos ($ED_{90}=13,08$ µg/mL) e na qual os danos no tegumento se apresentaram intensos. Complementarmente, na análise pelo *docking* molecular pode-se observar que a inibição da enzima não foi realizada diretamente no sítio, e que as melhores energias de interação com a 7-epi foram em uma cavidade próxima ao sítio e na junção dos monômeros. Finalmente, foram feitas análises quantitativas por qPCR do RNAm da SOD do parasito, cujos resultados não demonstraram mudança expressiva na transcrição da enzima após ação da 7-epi. Embora haja um impacto sobre a atividade da SOD do *S. mansoni*, este não parece ser o mecanismo principal de ação da 7-epi. Desta forma, é imprescindível a avaliação inibitória deste composto em outras enzimas do parasito, bem como a análise de outros mecanismos não enzimáticos que elucidem a ação da 7-epi em vermes adultos de *S. mansoni*.

Palavras-chave: *Schistosoma mansoni*. 7-epiclusianona. Superóxido Dismutase. PCR. *Docking*.

ABSTRACT

Schistosomiasis is a neglected tropical disease with high morbidity and mortality, which currently affects more than 200 million people worldwide, counting only with praziquantel (PZQ) as a treatment option. Studies describe various parasite strains that are resistant to PZQ, making it necessary, studies of new drugs that can be used to treat schistosomiasis. One of the principles of drugs rational planning is to choose targets where the drug produces selective toxic effects on the pathogen, and for this is necessary to define the action mechanism of the proposed pharmaco. 7-epiclusianone (7-epi) already has schistosomicidal activity described, using as criteria of effectiveness: the motility, integument damage, mating, egg-laying and motility of the digestive and excretory system. In this direction, the present study analyzed the impact of the 7-epi against the protective mechanisms of adult worms of *S. mansoni* with the support of biochemical and biomolecular tools. An investigation of the degree of oxidative stress by malondialdehyde titre showed that the 7-epi at a concentration of 12,5 µg/mL has lower levels of lipid peroxidation rate comparing to the Kolliphor[®] control, but increased in concentration of 50 µg/ml (p <0,001). Similarly, when it investigated the activity of superoxide dismutase (SOD), an important parasite detox enzyme, in *ex vivo* context it was possible to see the 7-epi interfere in its activity significantly, compared to controls RPMI-1640 and Kolliphor[®] at a concentration of 12,5 µg /mL (p <0,001). This value corresponds to 30% of the entire enzyme activity regarding Kolliphor[®] and is close to the effective dose that killed 90% of the parasites (ED₉₀=13,08 µg/mL) in which integument damages were intense. In addition, the analysis by molecular docking can observe that the inhibition of the enzyme was not performed directly on site, and that the best interaction energies with 7-epi were in a cavity near the site and in the dimer's junction. Finally, quantitative analyzes were made by qPCR of mRNA from SOD of the parasite, that results showed no significant change in enzyme transcription after the 7-epi action. Although there is an impact on the activity of SOD of *S. mansoni*, this does not seem to be 7-epi main mechanism of action. Thus, it is essential the inhibitory evaluation of this compound in other parasite enzymes as well as the analysis of other non-enzymatic mechanisms that elucidate the action of 7-epi in adult worms of *S. mansoni*.

Keywords: *Schistosoma mansoni*. 7-epiclusianone. Superoxide dismutase. PCR. Docking.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Ciclo heteroxênico do <i>S. mansoni</i>	20
Figura 2 -	Estrutura da 7-Epiclusianona.	26
Figura 3 -	Desenvolvimento da resposta imune durante períodos variados da infecção...27	
Figura 4 -	Composição do tegumento do <i>S. mansoni</i>	28
Figura 5 -	Conversão do peróxido em radical hidroxil na presença de íons metálicos.	30
Figura 6 -	Estrutura do Cromassie Blue G-250.	36
Figura 7 -	Sistema de Xantina/Xantina Oxidase gerando O ₂ ⁻ reduzindo o WST-1 para WST-formazan.....	37
Figura 8 -	Cromatografia líquida de alta eficiência da amostragem de 7-epiclusianona após a segunda recristalização comprovando o grau de pureza superior a 99,0%. O pequeno pico encontrado em aproximadamente 2 minutos de corrida refere-se ao solvente utilizado na corrida.	48
Figura 9 -	Ovos encontrados no sexto dia após a retirada dos compostos.	50
Figura 10 -	Análise das concentrações de malondialdeído presentes nos precipitados das amostras. (*) Dados que não apresentaram diferença estatística significativa com p<0,001.	52
Figura 11 -	Análise das concentrações de MDA presentes nos sobrenadantes das amostras. (*) Dados que não apresentaram diferença estatística significativa com p<0,001.	53
Figura 12 -	Análise das concentrações somadas de MDA. (*) Dados que não apresentaram diferença estatística significativa com p<0,001.	53
Figura 13 -	Atividade de SOD presente no sobrenadante do homogenato de <i>S. mansoni</i> , dada em unidades por mg de proteína presente na amostra. (*) Grupos que não apresentaram diferença estatística significativa com p<0,01. (**) Grupos que não apresentaram diferença estatística significativa com p<0,001.	55
Figura 14 -	Oitavo dia do teste parasitológico. A: Fêmea do grupo 12,5 µg/mL com o tegumento já desprendido; B: Macho do grupo 12,5 µg/mL com o tegumento ainda sendo desprendido; C: Casal do grupo RPMI-1640 com o tegumento intacto.....	55
Figura 15 -	Função de score utilizada pelo AutoDock4.	56
Figura 16 -	Representação gráfica da interação entre a 7-epiclusianona e a SOD	

	monomérica com o íon de cobre na forma +1, calculada por experimento de docking. Gráfico plotado pelo programa ligplot. Os arcos vermelhos representam interações hidrofóbicas e os tracejados verdes pontes de hidrogênio.	58
Figura 17-	Conformação de interação entre a 7-epiclusianona(ciano) e a SOD monomérica(verde) com o íon de cobre(ciano) na forma +1, calculado por experimento de docking. Imagem renderizada pelo programa vmd.....	58
Figura 18 -	Representação gráfica da interação entre a 7-epiclusianona e a SOD dimérica na caixa 3, calculada por experimento de docking. Gráfico plotado pelo programa ligplot. Os arcos vermelhos representam interações hidrofóbicas e os tracejados verdes pontes de hidrogênio.	60
Figura 19 -	Conformação de interação entre a 7-epiclusianona(ciano) e a SOD monomérica(cadeia A em verde e B em rosa) na caixa 3, calculado por experimento de docking. Imagem renderizada pelo programa vmd.....	60
Figura 20 -	Representação gráfica da interação entre a 7-epiclusianona e a SOD dimérica na caixa 6, calculada por experimento de docking. Gráfico plotado pelo programa ligplot. Os arcos vermelhos representam interações hidrofóbicas e os tracejados verdes pontes de hidrogênio.	61
Figura 21 -	Conformação de interação entre a 7-epiclusianona(ciano) e a SOD monomérica(cadeia A em verde e B em rosa) na caixa 6, calculado por experimento de docking. Imagem renderizada pelo programa vmd.....	61
Figura 22 -	Representação gráfica da interação entre a 7-epiclusianona e a SOD monomérica na caixa 4, calculada por experimento de docking. Gráfico plotado pelo programa ligplot. Os arcos vermelhos representam interações hidrofóbicas e os tracejados verdes pontes de hidrogênio.	62
Figura 23 -	Conformação de interação entre a 7-epiclusianona(ciano) e a SOD monomérica(rosa) na caixa 4, calculado por experimento de docking. Imagem renderizada pelo programa vmd.....	63
Figura 24 -	Estrutura SYBR Green I®.	64
Figura 25 -	Avaliação da expressão da SOD por qPCR e utilizando a ACT como gene constitutivo de referência. Os parasitos tratados in vitro e o eixo Y representa o Ct de cada amostra.	65
Figura 26 -	Expressão relativa da SOD comparando os ΔC_t tendo como base a expressão do grupo saudável RPMI.	65

Quadro 1 –	Centro de sítios de ligaçãoSo alternativos localizados pelo programa AutoLigand.....	41
Quadro 2 –	Script utilizado que direciona o docking em sítios alternativos.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS

7-epi	-7-Epiclusianona
ACT	-Actina
ATB	-Ácido Tiobarbitúrico
CLAE	-Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CPH	-Complexo Principal de Histocompatibilidade
Ct	- <i>Cycle Threshold</i>
Cu/ZnSOD	-Superóxido Dismutase Cobre e Zinco
dsDNA	-DNA dupla fita
ED ₅₀	-Dose Efetiva para 50% da População
ED ₉₀	-Dose Efetiva para 90% da População
ERNs	-Espécies Reativas de Nitrogênio
EROs	-Espécies Reativas de Oxigênio
FeSOD	-Superóxido Dismutase Ferro
FNT	-Fator de Necrose Tumoral
H ₂ O ₂	-Peróxido de Hidrogênio
IL-1	-Interleucina-1
IL-6	-Interleucina-6
IL-10	-Interleucina-10
MDA	-Malondialdeído
MnSOD	-Superóxido Dismutase Manganês
NaOH	-Hidróxido de Sódio
NO·	-Óxido Nítrico
NO ₂	-Dióxido de Nitrogênio
NO ₂ ⁺	-Íon Nitronium
O ₂ ⁻	-Ânion Superóxido
OH·	-Radical Hidroxil
ONOO ⁻	-Peróxinitrito
PBS	-Tampão Fosfato
PCR	-Reação em Cadeia da Polimerase
PZQ	-Praziquantel
qPCR	-Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RT-PCR	-Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
SmCTSOD	-Superóxido Dismutase Citosólica de <i>S. mansoni</i>
SmECSOD	-Superóxido Dismutase Extracelular de <i>S. mansoni</i>
SOD	-Superóxido Dismutase
Th 1	-T Helper 1
Th 2	-T Helper 2
WST-1	- <i>Water Soluble Tetrazolium-1</i>
WST-formazan	- <i>Water Soluble Tetrazolium-Formazan</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Análise de motilidade, funcionamento do sistema digestivo e danos no tegumento dos parasitos.....	49
Tabela 2 -	Análise quantitativa da oviposição durante os 8 dias de avaliação do novo veículo.....	49
Tabela 3 –	Energias de interação entre a SOD e a 7-epiclusianona no sítio ativo.....	57
Tabela 4 –	Energias de interação obtidas pelo programa AutoDock4 entre a proteína SOD e a molécula 7-epiclusianona em diferentes sítios de ligação para a proteína na forma dimérica.....	59
Tabela 5 –	Energias de interação obtidas pelo programa AutoDock4 entre a proteína SOD e a molécula 7-epiclusianona em diferentes sítios de ligação para a proteína na forma monomérica.....	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVOS GERAIS	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	JUSTIFICATIVA	17
4	REVISÃO TEÓRICA	18
4.1	ESQUISTOSSOMOSE	18
4.1.1	Epidemiologia	18
4.1.2	Ciclo biológico do parasito	19
4.1.3	Patologia	20
4.2	TRATAMENTO	23
4.2.1	Avaliação de novos compostos	24
4.2.2	Produtos naturais	24
4.3	ESTRATÉGIAS DE DEFESA DO PARASITO	26
4.3.1	A modulação da resposta imune	26
4.3.2	O tegumento	27
4.3.3	Detoxificação das espécies reativas	28
4.3.3.1	Superóxido dismutase (SOD)	30
5	METODOLOGIA	32
5.1	ISOLAMENTO DA 7-EPICLUSIANONA	32
5.2	ANIMAIS E PARASITOS	32
5.3	AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE DO KOLLIPHOR® EL	33
5.4	AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA SOD	34
5.4.1	Preparo do homogenato	34
5.4.2	Avaliação do grau de Peroxidação Lipídica	35
5.4.3	Quantificação das proteínas totais	35
5.4.4	Atividade da SOD	37
5.4.5	Cálculo da atividade de SOD em U/mg	37
5.5	DOCKING MOLECULAR	38
5.5.1	Docking molecular entre a SOD e a 7-epiclusianona em sítios alternativos	40
5.6	AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DO RNA _m CODIFICADOR DA SOD	44

5.6.1	Obtenção e tratamento do parasitos	44
5.6.2	Extração do RNA	44
5.6.3	Conversão para cDNA	44
5.6.4	Desenho dos primers	45
5.6.5	qPCR	45
5.6.6	Análise comparativa da expressão	46
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	66
	REFERÊNCIAS	67

1 INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença negligenciada, associada à pobreza e ao subdesenvolvimento, favorecida pela falta de saneamento básico e uso de coleções de água contaminada. Dentre a população mundial estipula-se que cerca de 207 milhões de pessoas estão infectadas em 76 países, dentre as quais 120 milhões apresentam sintomas e 20 milhões manifestam a doença na forma grave e, há ainda 779 milhões de pessoas sob o risco de infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; CHITSULO et al., 2000; ENGELS et al., 2002; STEINMANN et al., 2006). Essa doença é alvo de enormes preocupações atualmente, uma vez que a ausência de vacinas torna o tratamento do paciente depende da quimioterapia com praziquantel (PZQ). Desse modo, o aparecimento de casos de resistência à droga e prováveis recorrências da infecção têm incentivado a busca por novos protótipos de fármacos possivelmente de recursos naturais (ABDEL-HAFEEZ et al., 2012; MANTAWY, MONA MOHAMED; ALI; RIZK, 2011).

O *Schistosoma mansoni* é um trematódeo capaz de se manter viável no hospedeiro até 10 anos, ao passo que, por seu habitat ser intravascular promove um contato íntimo com o sistema imune do hospedeiro, demonstrando que o parasito desenvolveu mecanismos para evadir a resposta imune, aumentando a longevidade tanto do próprio parasito quanto do hospedeiro (HONG; KOSMAN; THAKUR, 1992; VAN HELLEMOND et al., 2006). Parte desses recursos está associada à estrutura do tegumento, o qual secreta e/ou expõe substâncias que influenciam na resposta do hospedeiro, ou ainda, recobrem o parasito formando uma barreira capaz de mimetizar antígenos do indivíduo, refratando a resposta imune (MCLAREN; HOCKLEY, 1977; VAN HELLEMOND et al., 2006). Além do mimetismo, o tegumento apresenta uma renovação muito rápida, principalmente em áreas danificadas, sendo, também, recoberto por proteínas que degradam imunoglobulinas e não permitem a aderência de granulócitos (ABATH; WERKHAUSER, 1996; VAN HELLEMOND et al., 2006).

Durante a resposta imune ocorre uma sinergia entre a citocina efetora de resposta Th1 ou Th2 e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) ou de oxigênio (EROs), respectivamente. Devido à predominância da resposta Th2 na fase crônica, as EROs tornam-se responsáveis pelos danos nos parasitos adultos. Para este estudo foi escolhida uma enzima que detoxifica uma das principais EROs que entram em contato com o parasito, o ânion superóxido (O_2^-) (CALLAHAN; CROUCH; JAMES, 1988; HONG; KOSMAN; THAKUR, 1992; MAIZELS et al., 1993). Na manutenção dos níveis de O_2^- se faz necessária a enzima superóxido dismutase

(SOD), uma metaloenzima ubíqua capaz de acelerar a conversão de superóxido para peróxido de hidrogênio. Esta enzima é a única presente no parasito que efetua a detoxificação do superóxido, tornando-a um alvo interessante para o trabalho. Outro fator que colabora com a escolha da enzima é a existência de um modelo de homologia entre a enzima parasitária e a humana, que propõe duas substituições (E132L e K135V) na entrada do canal de entrada do sítio ativo do cobre, levando a alterações conformacionais que podem resultar em alguma seletividade na atuação do composto (CARDOSO et al., 2004).

Castro et al. (2015a) observaram que a 7-epiclusianona (7-epi), uma benzofenona obtida da *Rheedia brasiliensis*, apresenta atividade esquistossomicida, entretanto não foi feita nenhuma análise detalhada do mecanismo de ação principalmente em termos bioquímicos e moleculares. A descrição de como uma droga atua direciona o tratamento e permite avaliar a sua seletividade, auxiliando na detecção de efeitos colaterais. Dessa forma, o presente estudo analisou o impacto da 7-epi nos mecanismos de camuflagem e proteção do *S. mansoni* no contexto *ex vivo*. Para isso, fez-se uma análise bioquímica para avaliar tanto a peroxidação lipídica quanto a atividade da SOD parasitária após a ação do composto sobre vermes adultos de *S. mansoni*. Além disso, realizou-se uma investigação em nível de expressão da enzima SOD do parasito, quantificando o RNAm após ação da 7-epi nesse contexto. Complementarmente, executou-se uma análise *in silico* para avaliar a forma de interação do composto com a enzima.

2 OBJETIVOS

Nos itens à seguir são descritos os objetivos do trabalho de forma geral e específica respectivamente.

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a interferência da 7-epiclusianona no mecanismo de detoxificação do ânion superóxido.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Isolar a 7-epiclusianona a partir de extratos de *Garcinia brasiliensis* usando cromatografia em coluna;
- b) Avaliar a intensidade da peroxidação lipídica em parasitos incubados com diferentes concentrações de 7-epi;
- c) Analisar a atividade enzimática da superóxido dismutase parasitária na presença da 7-epi em diferentes concentrações;
- d) Avaliar a interação entre a 7-epi e a enzima no contexto *in silico* através da técnica de *Docking* Molecular;
- e) Analisar o impacto da 7-epiclusianona em diferentes concentrações na expressão da SOD em *S. mansoni*;
- f) Relacionar os dados obtidos com as análises bioquímicas e moleculares com a atividade esquistossomicida *in vitro*.

3 JUSTIFICATIVA

O estudo de Castro et al. (2015a) mostrou que a 7-epiclusianona apresenta atividade esquistossomicida, mostrando que o composto foi capaz de influenciar na motilidade, oviposição, acasalamento e capaz de causar danos tegumentares, entretanto não foi discutido ainda o mecanismo de ação da mesma de forma mais aprofundada. A descrição de como uma droga atua direciona o tratamento e permite avaliar a sua seletividade, auxiliando na detecção de efeitos colaterais.

O tegumento é uma estrutura fundamental na relação parasito-hospedeiro, influenciando diretamente no sucesso da infecção e a sobrevivência do helminto, e tem sido um alvo importante para o desenvolvimento de medicamentos esquistossomicidas (EL RIDI; TALLIMA, 2013; LEOW et al., 2015; VAN HELLEMOND et al., 2006). Fatores que comprometam a integridade dessa estrutura, tornam o parasito vulnerável a uma resposta intensa do sistema imune (COLLEY; SECOR, 2014; PEARCE; MACDONALD, 2002).

Devido à predominância da resposta Th2 na fase crônica, para este estudo a enzima escolhida foi a superóxido dismutase, por ter papel fundamental na detoxificação do ânion superóxido (O_2^-). Esta espécie reativa de oxigênio é capaz de potencializar o efeito danoso oxidativo causado ao helminto pelos granulócitos (CALLAHAN; CROUCH; JAMES, 1988; HONG; KOSMAN; THAKUR, 1992; MAIZELS et al., 1993). Todavia, não foram feitos estudos mais aprofundados em relação à SOD enquanto alvo de compostos com atividade esquistossomicida nos contextos *ex vivo* e *in vivo*.

Desta forma o presente estudo se justificou pela necessidade de avaliar a atividade da 7-epiclusianona nos mecanismos de camuflagem e proteção do *S. mansoni* com o auxílio de ferramentas bioquímicas e biomoleculares. Para tanto, foi feita uma investigação em nível de expressão e atividade *ex vivo* da SOD parasitária após a ação da 7-epiclusianona nos vermes adultos de *S. mansoni* no contexto *in vitro*.

4 REVISÃO TEÓRICA

Este capítulo consiste na revisão dos temas abordados no trabalho.

4.1 ESQUISTOSSOMOSE

A esquistossomose é uma doença negligenciada, associada à pobreza e subdesenvolvimento, favorecida pela falta de saneamento básico e uso de águas contaminadas com a forma infectante do hospedeiro vertebrado, a cercária.

4.1.1 Epidemiologia

Ao redor do mundo são cerca de 250 milhões de pessoas infectadas em 76 países, com 120 milhões apresentando sintomas e 20 milhões com a doença na forma grave, e ainda, 800 milhões de pessoas sob o risco de infecção (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; BARSOUM, R. S.; ESMAT; EL-BAZ, 2013; FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2015). Os causadores da infecção no homem são o *Schistoma mansoni*, *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mekongi* e *Schistosoma intercalatum*, sendo as três primeiras espécies as de maior relevância (BARSOUM, R.; ESMAT; EL-BAZ, 2013; COLLEY; SECOR, 2014; HOFFMANN; WYNN; DUNNE, 2002), causando cerca de 280 mil mortes por ano (VAN DER WERF et al., 2003). A infecção leve ou branda causada pelo *S. mansoni* geralmente só apresenta sintomas na fase crônica, sendo difícil seu diagnóstico em estágios iniciais. A cronicidade leva às formas clínicas incapacitantes para homens e mulheres em suas idades mais produtivas. O *S. mansoni* é a espécie responsável pela esquistossomose no Brasil, doença a qual abrange 19 estados. Focos isolados de transmissão constante estão localizados desde o Maranhão até o Espírito Santo e Minas Gerais (COURA, J.; AMARAL, 2004; GUIMARÃES et al., 2012; SARVEL et al., 2011). No Brasil são estimadas 8 milhões de pessoas infectadas e 30 milhões expostas às áreas de risco (KATZ, NAFTALE; PEIXOTO, 2000; VAN-LUME et al., 2013).

4.1.2 Ciclo biológico do parasito

Na esquistossomose mansônica a forma larvária que infecta o hospedeiro definitivo é a cercária. Trata-se de uma forma aquática liberada nas horas mais claras do dia, estimulada pela luz e altas temperaturas. A cercária entra em contato com o hospedeiro definitivo e libera proteases que auxiliam na penetração, induzindo uma resposta alérgica responsável pela dermatite cercariana (KOLÁŘOVÁ et al., 2013; LAMBERTUCCI, 2010). A cercária perde a cauda e se transforma no esquistossômulo, uma forma intermediária que migra pelos vasos sanguíneos até a circulação pulmonar e depois é conduzido pela circulação arterial até o fígado, finalizando a maturação para verme adulto (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016; LAMBERTUCCI, 2010). As formas adultas se alojam no plexo mesentérico, reproduzindo-se sexuadamente e iniciando a postura de ovos, estimando que cada fêmea acasalada produza cerca de 300 ovos por dia (GRYSEELS, B; DE VLAS, 1996; LOVERDE; CHEN, 1991). Uma parcela destes ovos não consegue atingir a luz intestinal e se deposita nos tecidos, principalmente hepático, gerando granulomas que podem vir a causar fibrose com potencial perda da função tecidual (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). A porção que atinge a luz intestinal contamina as fezes, que ao atingirem coleções de água possibilitam a eclosão do miracídeo. Esta é uma segunda forma aquática atraída por quimiotaxia pelo hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria* sp., a qual penetra no caramujo por ação lítica e movimentos rotatórios. No hospedeiro intermediário o miracídeo se diferencia em esporocisto, que se reproduz assexuadamente produzindo milhares de cercárias (GRYSEELS, BRUNO et al., 2006; KING; DANGERFIELD-CHA, 2008; NEGRÃO-CORRÊA et al., 2012).

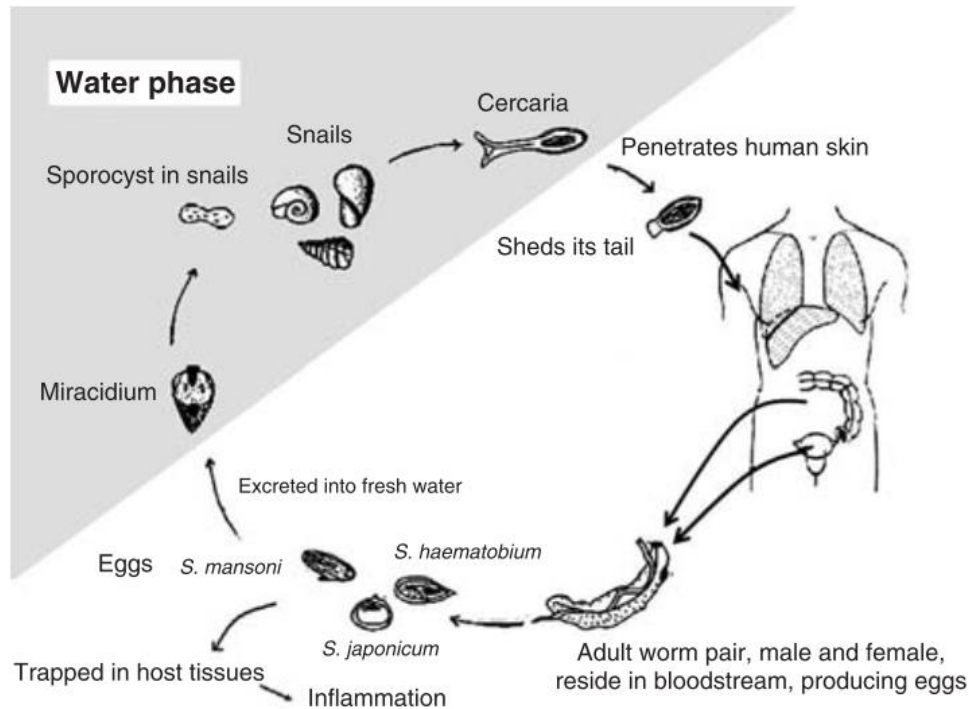


Figura 1 - Ciclo heteroxênico do *S. mansoni*.
 Fonte: KING e DANGERFIELD-CHA, (2008, p.68).

4.1.3 Patologia

Os sintomas correspondem ao estágio de desenvolvimento da infecção e varia dependendo da intensidade do parasitismo, localização, da capacidade de resposta do indivíduo e do tratamento instituído (GRYSEELS, B; DE VLAS, 1996; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). A dermatite de contato marca o início da fase aguda, durando até 15 dias após a infecção. A forma aguda consiste em uma reação de hipersensibilidade que ocorre com a transformação da cercária em esquistossômulo e a migração do mesmo, que pode ser observada do 16º ao 90º dia de infecção. Nesta fase a resposta imune predominante é Th1, com altos índices séricos de IL-2, interferon-gama e fator de necrose tumoral α . A sintomatologia característica se baseia em febres, calafrios, fraqueza, anorexia, náusea, diarreia e o quadro desaparece gradativamente com o tempo sem intervenção terapêutica (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013; LAMBERTUCCI, 2010; LAMBERTUCCI et al., 1987). Os esquistossômulos atingem o fim de seu desenvolvimento dando origem aos parasitos adultos, os quais são menos susceptíveis aos mecanismos efetores do sistema imune do hospedeiro. Estes atingem a maturidade sexual, acasalam e iniciam a oviposição (GARCIA, LYNNNE SHORE, 2007). Na fase crônica, com

início de 6 a 8 semanas, os ovos já depositados em diversos tecidos estimulam a conversão da resposta imune para um sistema predominantemente Th2 através da liberação de secreções ovulares. Estas secreções estimulam uma reação granulomatosa ao redor do ovo com fibrose do tecido adjacente, a qual quando ocorre em grande escala pode causar perda de função no tecido atingido sendo responsável pela sintomatologia da fase crônica (COLLEY; SECOR, 2014; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013).

A forma crônica pode ser dividida em diferentes estágios que variam com os tipos e intensidade dos sintomas. A mais leve é a forma intestinal, a qual se apresenta assintomática na maioria dos casos e quando apresenta sintomas, estes consistem em dor epigástrica, surtos diarreicos intercalados com constipação intestinal crônica e pirose (COURA, J. R., 2005; REY, 2001). Normalmente a modulação do granuloma na evolução do quadro agudo para o crônico acontece de forma amena, com modulação satisfatória, um número menor células inflamatórias e sem área de necrose em torno dos ovos com deposição de fibras colágenas. Acredita-se que quando esta modulação ocorre de forma ineficaz o quadro tende a evoluir para a forma hepatoesplênica (COURA, J. R., 2005; REY, 2001).

É denominada como forma hepatointestinal a forma intermediária entre a intestinal e a hepatoesplênica. Uma ultrasonografia abdominal auxilia na avaliação do quadro e o espessamento periportal sugere o grau de avanço para a forma hepatoesplênica (GERAPACHER-LARA et al., 1997). A laparoscopia e punção biológica do fígado já revelam a presença de lesões hepáticas discretas na forma intestinal. As queixas e sintomas são os mesmos, porém um pouco mais acentuadas (REY, 2001).

A forma hepatoesplênica é uma caracterização da esquistossomose hepática avançada, tendo como substrato anatômico a fibrose periportal. Muitos ovos, ainda que postos pelas fêmeas nos vasos do intestino, atingem os espaços capilares do plexo porta-hepático arrastados pela corrente sanguínea, onde as reações granulomatosas acumulam, levando ao desenvolvimento de um manguito fibroso em torno das ramificações intra-hepáticas da veia porta. Esta disposição sistematizada do tecido reacional caracteriza a fibrose periportal (ANDRADE; SILVA; DE SOUZA, 1997; COURA, J. R., 2005; MOHAMED-ALI *i*, 1999).

Os granulomas passam a contribuir com a hipertensão portal pelo desenvolvimento de tecido fibroso cicatricial, reduzindo o fluxo sanguíneo do território drenado pela veia porta. Este tecido fibroso pode até se revascularizar, porém os vasos de neoangiogênese são de origem arterial e servem apenas para assegurar a oxigenação e nutrição do parênquima hepático dentro dos limites normais, e não melhoram a circulação venosa, que chega ao fígado com dificuldade crescente (BLOOM; KEMP; LUBEL, 2015; ELBAZ; ESMAT, 2013; KEMP; VAUGHAN;

CHIN-DUSTING, 2005). Usualmente, passam pelo fígado 1,5 litro de sangue por minuto. Deste volume, 75% procedem da veia porta e 25% da artéria hepática. Parte dos processos degenerativos difusos são associados à disseminação de substâncias antigênicas pelo tecido hepático e à conseqüente reação inflamatória frente aos mesmos, ou ainda, a um tipo de reação de hipersensibilidade tardia, que estaria envolvida na progressão da fibrose periportal (COURA, J. R., 2005; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013; REY, 2001).

O maior impacto da fibrose periportal se deve à obstrução parcial situada nos ramos do sistema porta interlobular, os quais ficam envolvidos pela massa de tecido cicatricial (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Quando a obstrução circulatória se intensifica, e com ela, a pressão venosa no sistema porta, o sangue passa a circular em anastomoses já existentes entre os sistemas porta e cava inferior; e entre os sistemas porta e cava superior (ELBAZ; ESMAT, 2013; REY, 2001; SILVA, L. M. et al., 2006). Com o aumento da circulação colateral, os vasos abdominais chegam a ficar com diâmetro calibroso e as anastomoses, que geralmente eram imperceptíveis, tornam-se muito evidentes, principalmente nos vasos abdominais profundos. Na parede do esôfago a circulação colateral leva à evidenciação de veias varicosas de grosso calibre, susceptíveis à ruptura e hemorragias graves (BLOOM; KEMP; LUBEL, 2015; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013; KEMP; VAUGHAN; CHIN-DUSTING, 2005; SILVA, L. M. et al., 2006; TADROS; TRABER; HERNDON, 2000). Na fibrose esquistossomótica avançada, as veias esplênica e porta se apresentam muito grossas, alongadas e sinuosas. O tempo de circulação entre baço e fígado vai de 2 a 3 para 6 a 7 segundos. O resultado é uma hipertensão na veia porta e em todo o território drenado por ela (COURA, J. R., 2005). Esta hipertensão desencadeia congestão e edema na parede do estômago e dos intestinos, congestão e aumento de volume do baço, bem como alterações na circulação e atividade fisiológica de outros órgãos abdominais (REY, 2001; SILVA, L. M. et al., 2006; TADROS; TRABER; HERNDON, 2000).

O aumento do baço(esplenomegalia) em parte devido à congestão venosa, mas em contrapartida de uma hiperplasia das células do sistema macrófago-linfocitário, com diferenciação plasmocitária e produção de gamaglobulinas, semelhante às respostas em presença de grandes quantidades de material antigênico (COURA, J. R., 2005; GERSPACHER-LARA et al., 1998; HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013).

No tecido hepático está presente certo grau de hiperplasia e hipertrofia do sistema fagocítico mononuclear, cujas células de Kupffer se apresentam adjacentes ao interior dos capilares sinusóides e exibem grânulos de pigmento castanho-escuro(hemozoína), semelhantes ao pigmento malárico (REY, 2001; SANTOS, A. B. A.; SOUZA; ZILTON, 2000). Trata-se de um resíduo de digestão da hemoglobina, regurgitado pelos parasitos e depois fagocitado por

macrófagos. A quantidade depende diretamente da carga parasitária e da duração da infecção, pois o hospedeiro consegue metabolizar a hemozoína apenas de forma vagarosa (BARSOUM, R.; ESMAT; EL-BAZ, 2013; COURA, J. R., 2005).

No sangue as modificações mais notáveis compreendem: o aumento do volume sanguíneo, devido principalmente à maior quantidade de plasma e retenção de líquidos; anemia, leucopenia (com neutropenia e eosinofilia) e plaquetopenia, podendo estas estarem isoladas ou associadas e atribuíveis ao hiperesplenismo. Pode ocorrer ainda infantilismo devido ao sequestro de hormônios gonadotrópicos (BARSOUM, R.; ESMAT; EL-BAZ, 2013; COURA, J. R., 2005; TADROS; TRABER; HERNDON, 2000).

Quando estas alterações estão presentes, porém não impactando de forma preocupante no âmbito clínico, e ainda, as funções hepáticas se mantêm preservadas, o quadro é caracterizado como hepatoesplênico compensado. Nas fases mais avançadas da doença ocorrem hemorragias digestivas que agravam o quadro geral, aparecendo em consequência edemas, derrame cavitário(ascite) e as provas de função hepática podem acusar comprometimento do hepatócito. Esta fase é denominada hepatoesplênica descompensada (BARSOUM, R.; ESMAT; EL-BAZ, 2013; COURA, J. R., 2005; REY, 2001).

4.2 TRATAMENTO

A estratégia atual de combate à esquistossomose une o controle quimioterápico com medidas preventivas, como a educação em saúde e o saneamento, além do controle dos hospedeiros intermediários, por meio do uso de moluscocidas, controle biológico e alterações no ambiente aquático (BRASIL, 1998).

O Praziquantel (PZQ) é atualmente o medicamento de escolha segundo a OMS para o tratamento em larga escala da esquistossomose, sendo efetivo contra as cinco espécies de *Schistosoma* (DOENHOFF et al., 2002; ENGELS et al., 2002). Apesar de grande parte dos mecanismos efetores do PZQ já estarem elucidados, como contração muscular, dano tegumentar e alterações metabólicas, este ainda se faz motivo de muitos estudos, buscando não só ampliar a compreensão do funcionamento do composto, mas também como estão funcionando os mecanismos de resistência do parasito (ARAGON et al., 2009; CIOLI, DONATO et al., 2014; ENGELS et al., 2002).

A doença é alvo de grandes preocupações atualmente, pois devido à falta de vacina, a

terapia do paciente depende da quimioterapia com o Praziquantel. Outro fator que aumenta esta preocupação com o tratamento da doença é o aparecimento de casos de resistência à droga. Um estudo global publicado por Cioli et al. (1995) mostrou que três diferentes laboratórios (Roma: Itália; Gisa: Egito; e Bangor: Inglaterra), apresentaram diferentes respostas ao PZQ, sendo que quatro das cepas isoladas não possuíam contato prévio com a droga e cinco deles apresentaram resistência ao Praziquantel em ensaios anteriores, quer por indução e/ou seleção, ou porque foram isoladas de pacientes curados. Esta condição incentiva a busca por novos protótipos de fármacos (ABDEL-HAFEEZ et al., 2012; MANTAWY, MONA MOHAMED; ALI; RIZK, 2011).

4.2.1 Avaliação de novos compostos

A avaliação da atividade de drogas com potencial esquistossomicida parte da comparação entre um composto referência e um grande número de protótipos. Nesta primeira fase são avaliados o grau de motilidade, presença de acasalamento, postura de ovos, movimentação e conteúdo do sistema digestivo e danos no tegumento (BARROS et al., 2015; KATZ, N.; COELHO, 2008; MAGALHÃES et al., 2010). Ao obter o composto ativo almeja-se saber o máximo sobre ele, iniciando em seguida, a fase de ensaios não clínicos (FDA, 2015). Nessa fase é interessante conhecer a dose mínima eficaz; a melhor via de administração; as possíveis reações adversas e efeitos tóxicos; e ação sobre as diferentes fases evolutivas do verme, para avaliar o maior número de indicadores para que se possam demonstrar a atividade terapêutica, bem como o estudo do mecanismo e o modo de ação da droga (CIOCIOLO; COHEN; KULKARNI, 2014; CIOLI, DONATO et al., 2008).

4.2.2 Produtos naturais

O uso da medicina popular direciona a busca por novos compostos bioativos em screenings de produtos naturais (CHIN et al., 2006; YOUSIF et al., 2007) e a maioria dos farmacóforos conhecidos de hoje são miméticos de algum composto encontrado na natureza (CRAGG; NEWMAN, 2013). Segundo Wink (2012), plantas produzem uma grande

diversidade de metabólitos secundários com atividades biológicas interessantes, como propriedades citotóxicas, anti-parasitárias e anti-microbianas.

Um dos primeiros exemplos documentados de plantas utilizadas na medicina popular é o alho. O alho (*Allium sativum*) e cebola (*Allium cepa*) são utilizados em todo o mundo com aplicação para diferentes doenças, como infecções, lesões, disfunções gastrointestinais e doenças cardiovasculares. O tratamento com óleo essencial de alho além de apresentar atividade esquistosomicida atuou como antiinflamatório, protegendo as células hepáticas dos danos causados pela fibrose induzida pelos ovos do parasito (MANTAWY, M M et al., 2012; MANTAWY, MONA MOHAMED; ALI; RIZK, 2011).

Diversos estudos exploraram parte dos bioativos presentes em plantas da família Piperaceae, utilizando desde extratos e frações dos mesmos a moléculas isoladas. Estudos com o óleo essencial de *Piper cubeba* evidenciaram o potencial esquistosomicida do mesmo contra cercárias, esquistosômulos e vermes adultos (MAGALHÃES et al., 2012). O grupo de Rapado et al. 2013 demonstrou o potencial moluscida da piplartina, um amido encontrado em diversas plantas do gênero *Piper*, apresentando uma nova opção menos tóxica para o controle do hospedeiro intermediário.

Estudos fitoquímicos provaram que o gênero *Rheedia* ou *Garcinia*, é rico em compostos fenólicos, nomeadamente as benzofenonas, xantonas e flavonóides (MONACHE; MONACHE; BETTOLO, 1983; MONACHE et al., 1984). Uma classe que recebe muito foco é a das benzofenonas, e em especial as polipreniladas, que possuem atividades biológicas dos mais diversos tipos (GAO et al., 2010; WU; LONG; KENNELLY, 2014). A *Rheedia brasiliensis* permite o isolamento de alguns destes bioativos, como o biflavonóide Fukugentina, o qual apresentou atividade contra amastigotas e promastigotas de *L. Amazonensis* e sem toxicidade significativa para células de mamíferos (PEREIRA, IVAN O et al., 2011); A Guttiferona A, benzofenona pentaprenilada trihidroxil substituída, com atividade na inibição de cisteína e serinoproteases, antiproteolítica, antitumoral e leishmanicida, esquistosomicida (BARROS et al., 2015; MARTINS et al., 2009; PEREIRA, I O et al., 2010); e a substância foco deste trabalho, a 7-epiclusianona (SANTOS, M. H. DOS et al., 1999) (Figura 2), uma benzofenona triprenilada que já possui estudos que comprovam atividades antibacteriana (ALMEIDA et al., 2008), vasodilatadora (CRUZ et al., 2006), antianafilática (NEVES et al., 2007), anti-HIV (PICCINELLI et al., 2005), e antiparasitária contra leishmaniose (PEREIRA, I O et al., 2010), tripanossomose (ALVES et al., 1999) e esquistosomose (CASTRO et al., 2015).

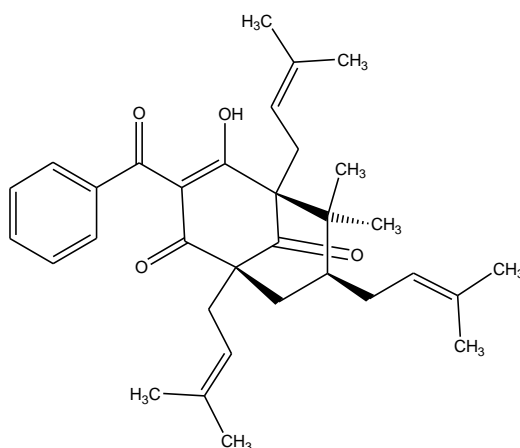


Figura 2 - Estrutura da 7-Epiclusianona.
Fonte: Do autor.

4.3 ESTRATÉGIAS DE DEFESA DO PARASITO

O *S. mansoni* é um trematódeo capaz de se manter viável no hospedeiro até 10 anos, ao passo que, por seu habitat ser intravascular promove um contato íntimo com o sistema imune do hospedeiro, demonstrando que o parasito desenvolveu mecanismos para evadir a resposta imune, aumentando a longevidade tanto do próprio parasito quanto do hospedeiro (HONG; KOSMAN; THAKUR, 1992; VAN HELLEMOND et al., 2006). Parte desses recursos está associada à estrutura do tegumento, o qual secreta e/ou expõe substâncias que influenciam na resposta do hospedeiro, ou ainda, recobrem o parasito formando uma barreira capaz de mimetizar antígenos do indivíduo, dificultando o reconhecimento imune (MCLAREN; HOCKLEY, 1977; VAN HELLEMOND et al., 2006). Além do mimetismo, o tegumento apresenta uma renovação muito rápida, principalmente em áreas danificadas (ABATH; WERKHAUSER, 1996; VAN HELLEMOND et al., 2006)

4.3.1 A modulação da resposta imune

A resposta imune do hospedeiro tanto regula a intensidade da inflamação quanto facilita a sobrevivência e replicação do parasito (HAMS; AVIELLO; FALLON, 2013). Durante a fase aguda da doença, a produção fator de necrose tumoral (FNT), interleucina-1 (IL-1) e 6 (IL-6) é

estimulada por antígenos do parasito, principalmente de seus estágios mais precoces, como o esquistossômulo na pele e pulmão, os quais ainda não desenvolveram o mimetismo e ficam mais vulneráveis a uma resposta mais intensa. Um aumento destas citocinas caracteriza uma resposta dominante T Helper 1 (Th1), de carácter inflamatório (DE JESUS et al., 2002; MAIZELS R. M., BUNDY D. A., SELKIRK M. E., SMITH D. F., 1993). Com a evolução da infecção o parasito inicia a postura de ovos, os quais passam a liberar as secreções ovulares, capazes de induzir a produção maciça de interleucina 10 (IL-10). Esta interleucina inibe a maturação da resposta celular e direciona os plasmócitos, tornando-se predominantemente T Helper 2 (Th2) (MONTENEGRO et al., 1999; PEARCE; MACDONALD, 2002) (). A resposta humoral, associada à presença do parasito adulto, confere imunidade protetora à reinfecção ao hospedeiro e favorece a formação do granuloma (REY, 2001).

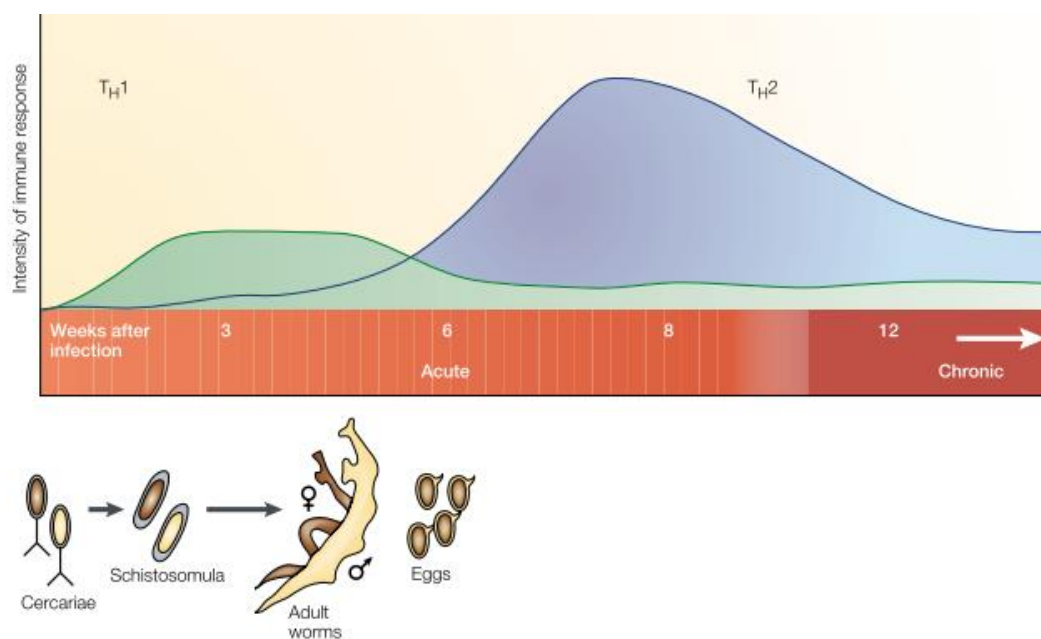


Figura 3 - Desenvolvimento da resposta imune durante períodos variados da infecção.
Fonte: PEARCE; MACDONALD (2002, p.501)

4.3.2 O tegumento

No tegumento do parasito ocorre um fenômeno denominado mimetismo molecular, no qual alguns epítomos do material deglutido pelo parasito são secretados ou expostos em seu próprio tecido, conferindo-lhe uma espécie de camuflagem (ABATH; WERKHAUSER, 1996; MAIZELS et al., 1993). Sher e Moser (1981) detectaram a presença de glicoproteínas do

Complexo Principal de Histocompatibilidade (CPH) no tegumento de esquistossômulos de 4 a 6 dias de idade, mostrando que o mimetismo se inicia até mesmo em estágios mais precoces da infecção. Existem outros relatos de mimetismos na literatura, como exemplo o fator de aceleração de decaimento (que proporciona proteção contra o sistema complemento), algumas lipoproteínas de baixa densidade (reduzem a superfície de contato de sítios de ligação de anticorpos) e algumas antiproteases (ABATH; WERKHAUSER, 1996; MAIZELS et al., 1993; VAN HELLEMOND et al., 2006).

Além do mimetismo, o tegumento apresenta uma renovação muito rápida, principalmente em áreas danificadas, além de ser recoberto por proteínas que degradam imunoglobulinas e não permitem a aderência de granulócitos (Figura 4)(ABATH; WERKHAUSER, 1996; BRASCHI; BORGES; WILSON, 2006; VAN HELLEMOND et al., 2006).

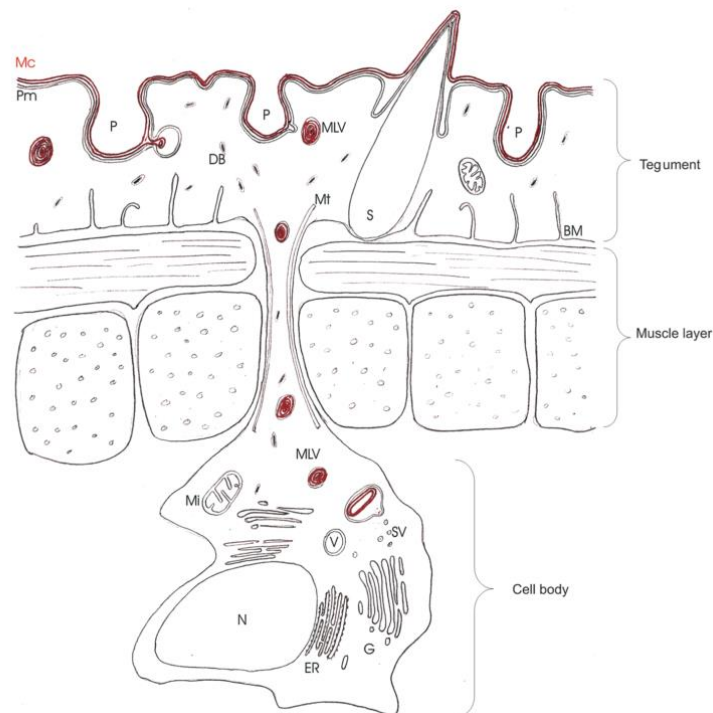


Figura 4 – Composição do tegumento do *S. mansoni*.
Fonte: BRASCHI; BORGES; WILSON (2006, p. 206)

4.3.3 Detoxificação das espécies reativas

Mesmo com todas as alternativas de evasão citadas nos tópicos anteriores, o parasito

ocasionalmente sofre danos pelo reconhecimento imune. Ocorre uma sinergia entre a citocina efetora de resposta Th1 ou Th2 e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) ou de oxigênio (EROs) respectivamente. Devido à predominância da resposta Th2 na fase crônica, para este estudo foi escolhido o mecanismo de detoxificação do ânion superóxido (O_2^-), uma espécie reativa capaz de potencializar o efeito danoso oxidativo causado ao helminto pelos granulócitos (CALLAHAN; CROUCH; JAMES, 1988; HONG; KOSMAN; THAKUR, 1992; MAIZELS et al., 1993).

O ânion superóxido é uma espécie produzida durante o metabolismo mitocondrial, podendo ser produzido também por eosinófilos, neutrófilos e macrófagos ativados durante o burst respiratório (HONG et al., 1992; POLJSAK, B. et al., 2011; YE, Z.-W. et al., 2014). O O_2^- por si só possui uma baixa reatividade, além de não poder atravessar membrana por possuir carga. O risco de níveis elevados de superóxido é que este pode se desmutar em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e este peróxido sim, tem a capacidade de atravessar membranas, reagir com íons metálicos (ex.: Fe^{+2}) dando origem a uma espécie extremamente reativa, o radical hidroxil ($OH\cdot$) (reação de Fenton; Reação 1, Figura 5), a qual é capaz de danificar DNA, membrana lipídicas e proteínas. O ânion superóxido pode também reduzir os íons metálicos que foram oxidados durante esta reação (reação 2, Figura 5). O sistema formado por estas duas reações é conhecido como reação de Haber-Weiss (Reação 3, Figura 5). Existe ainda a possibilidade do O_2^- reagir com o óxido nítrico ($NO\cdot$) formando peróxinitrito ($ONOO^-$), o qual se decompõe em $OH\cdot$, dióxido de nitrogênio (NO_2) e íon nitronium (NO_2^+) (ANDERSON; PHILLIPS, 1999; HALLIWELL, 1987; HUANG, 2012; YE, Z.-W. et al., 2014).

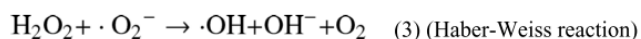
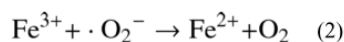
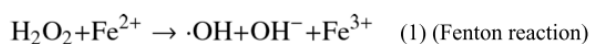


Figura 5- Conversão do peróxido em radical hidroxil na presença de íons metálicos.

Fonte: Huang, (2012a, p.4)

Ao mesmo tempo que as EROs e ERNs têm esta capacidade degenerativa, vale ressaltar que estas também apresentam suas funções como sinalizadores celulares. Esta condição impõe a necessidade de se haver um “balanço oxidativo”, onde são mantidas as concentrações fisiológicas destas espécies (POLJSAK, B. et al., 2011; POLJSAK, BORUT; MILISAV, 2014; YE, Z.-W. et al., 2014).

O fenômeno da peroxidação lipídica representa uma reação em cadeia de degradação de membranas lipídicas, e esta depende da presença de EROs para que a reação seja iniciada e mantida (MANTAWY, M M et al., 2012). A avaliação da intensidade da lipoperoxidação em um ambiente pode ser considerada como uma avaliação indireta do grau de estresse oxidativo presente no mesmo (HOULT; PAYÁ, 1996; LEE et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2013; SAYED; COOK; WILLIAMS, 2006).

4.3.3.1 Superóxido dismutase (SOD)

A enzima responsável por controlar os níveis de O_2^- é a superóxido dismutase (SOD), uma metaloenzima ubíqua capaz de acelerar a conversão de superóxido para peróxido de hidrogênio. Na natureza existem 3 isotipos da enzima que diferem no íon metálico, a MnSOD, FeSOD e a Cu/ZnSOD. No *Schistosoma mansoni* foi possível detectar a atividade de dois tipos de Cu/Zn (uma citosólica [SmCTSOD] e forma com um peptídeo sinal [SmECSOD]) e uma MnSOD (mitocondrial) (HONG et al., 1992, 1993; MKOJI; SMITH; PRICHARD, 1988; YE, Z.-W. et al., 2014).

A distinção dos dois tipos de Cu/Zn SOD foi proposta primeiramente por Simurda et al. (1988) em uma análise do mRNA que codificava a Cu/Zn SOD. Outros grupos (DA SILVA,

A C. et al., 1992; HONG et al., 1992) mostraram posteriormente a presença de uma isoforma citosólica ubíqua (a SmCTSOD) de 16 kDa, encontrada até mesmo em esquistossômulos de 3 horas. Outra forma de Cu/Zn SOD descrita na literatura é a extracelular (SmECSOD) (HONG et al., 1993). Hong et al. (1993) mostraram que a SmECSOD de 20 kDa possui uma extensão hidrofóbica e permite a N-glicosilação, porém esta é feita após a transcrição da proteína. Hong mostrou ainda que a SmECSOD não é secretada e se encontra na porção muscular subtegumental. A maioria das Cu/Zn SOD citosólicas de eucariotos são funcionais como dímeros, pois dependem da interação de alguns resíduos chave entre os monômeros para a estabilização de sua estrutura terciária (DENG et al., 1993; JAMES, 1994).

Um modelo de homologia entre a enzima parasitária e a humana propôs duas substituições (E132L e K135V) na entrada do canal de entrada do sítio ativo do cobre, mostrando alterações significativas no sítio ativo da enzima, fator o qual favorece uma potencial seletividade no mecanismo (CARDOSO et al., 2004).

5 METODOLOGIA

Neste capítulo são descritas as metodologias utilizadas na obtenção dos resultados.

5.1 ISOLAMENTO DA 7-EPICLUSIANONA

Os extratos foram feitos no Laboratório de Fitoquímica da UNIFAL-MG, a partir da maceração exaustiva por 72 h da casca do fruto de *Rheedia brasiliensis*, sendo concentrado em rotaevaporador com reutilização do solvente. Foram utilizados como solvente hexano e etanol, dando origem aos extratos etanólico e hexânico e a sílica utilizada específica para cromatografia em coluna, com tamanho de partícula entre 0,063-0,2 mm/70-230 mesh ASTM (Sigma-Aldrich, EUA). A coluna de vidro utilizada foi a mesma em todos os procedimentos. O diâmetro da coluna é de 6 cm, a altura de sílica é de 30 cm, o volume morto de aproximadamente 500 mL e o volume das frações é de 250 mL. Após a retirada de cada fração, a mesma foi submetida à rotaevaporação, com reaproveitamento do solvente. Os extratos foram submetidos à cromatografia em coluna, iniciando a corrida com hexano e aplicando teor crescente de acetato de etila. As frações foram agrupadas por homologia averiguada por cromatografia em camada delgada e por fim solubilizadas em metanol a quente (80°C máx.) e submetidas à recristalização. O grau de pureza (>99%) foi avaliado por cromatografia líquida de alta eficiência (CASTRO et al., 2015; SANTOS, M. H. DOS et al., 1999).

5.2 ANIMAIS E PARASITOS

Camundongos swiss, fêmeas, dois meses de idade, pesando em média 20 g, nascidos e criados no biotério do Centro de Pesquisas René Rachou/Fundação Oswaldo Cruz; foram mantidos em gaiolas devidamente identificadas no biotério da Universidade Federal de Alfenas e alimentados com ração comercial e água. Os experimentos realizados com os animais foram submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da UNIFAL. As cercárias de *S. mansoni*, cepa LE (Belo Horizonte), que foram usadas para infecção, serão fornecidas pelo Moluscário

do CPqRR, onde o ciclo do parasito é mantido utilizando-se o modelo *B. glabrata* – camundongo – *B. glabrata*.

Os camundongos foram inoculados no dorso, individualmente, por via subcutânea, segundo a técnica descrita por Pellegrino & Katz (1968). Para evitar desproporção entre os esquistossomos machos e fêmeas recuperados, foram utilizadas cercárias provenientes de 50 ou mais caramujos infectados (PELLEGRINO et al., 1977).

No prazo de 45 a 60 dias de infecção, os camundongos foram sacrificados por “overdose” de cloridrato de cetamina 10,0% (Cetamin - Syntec), administrado por via intraperitoneal ($\pm 0,2$ mL). Os trematódeos adultos obtidos através da perfusão retrógrada do fígado, de acordo com o método de Smithers e Terry (1965), onde com a exposição do mesentério e do coração a veia porta foi seccionada na altura dos rins com agulha de grosso calibre conectada a uma seringa. Simultaneamente, na porção inferior do ventrículo esquerdo do coração foi injetado meio de cultura RPMI 1640, pH 7,4 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) heparinizado (0,2%). Devido ao aumento da pressão nos vasos, o sangue extravasa, levando consigo os vermes adultos, sendo coletado em uma placa de petri com RPMI heparinizado e suplementado com soro fetal bovino (5%).

5.3 AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE DO KOLLIPHOR® EL

Os parasitos obtidos no item 5.2 foram transferidos para placa de cultura de 24 poços, um casal por poço. Os mesmos foram lavados cuidadosamente com RPMI-1640 suplementado com 5,0 % soro fetal bovino inativado pelo calor e 1,0 % de penicilina (10000UI/mL)/estreptomicina (10mg/mL) (Sigma-Aldrich, EUA).

Após um período de 30 min de adaptação, as soluções (7-epiclusianona nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,125 $\mu\text{g/mL}$ solubilizada em Kolliphor® EL [Cremophor – Sigma-Aldrich, EUA][Cada uma das diluições da 7-epi foi preparada separadamente de forma que em todas elas o veículo se apresentasse na mesma concentração, de 0,01%], o próprio veículo isolado (também a 0,01%) e uma concentração de 2,0 $\mu\text{g/mL}$ de PZQ) foram adicionadas às culturas e a placa foi conduzida à estufa a 37°C e 5,0 % de CO₂, e analisadas por 2 e 24 horas em contato com as amostras. Após 24 horas os poços foram lavados, para que as amostras fossem retiradas do contato com os parasitas, com a remoção do meio de cultura dos poços e acréscimo da mesma quantidade de meio estéril por 5 vezes.

Cada poço foi observado diariamente por 7 dias após a retirada dos compostos para avaliar se os vermes se recuperavam, comparando-os com os controles. A determinação dos ED₉₀ (dose efetiva para matar 90,0 % dos vermes) e ED₅₀ (dose efetiva para matar 50,0 % dos vermes) foram realizadas pelo programa de computador GraphPad Prism (versão 5.0). Os indivíduos encontrados no oitavo dia de observação sem movimentação alguma foram dados como mortos. A metodologia utilizada foi a de “*Dose-Response – Special > log(Agonist) vs. Response – Find ECanything*”.

5.4 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA SOD

Primeiramente foi feito o preparo da amostra.

5.4.1 Preparo do homogenato

Castro et al. (2015) utilizou o metanol a 1% como veículo para a 7-epi, mas no presente trabalho utilizou-se o Kolliphor[®] a 0,01% tendo em vista a maior solubilidade da 7-epi neste solvente; além de um menor impacto sobre a atividade da superóxido dismutase e uma menor toxicidade sobre parasito (dados não mostrados).

Para cada grupo de tratamento foram separados 40 casais (placa de 6 poços, 10 poços por grupo, com 4 casais em cada poço) de parasitos adultos (obtidos conforme item 5.2), os quais após 24 h cultivados em contato com os compostos (7-epi a 50, 25 e 12,5 µg/mL, Kolliphor[®] EL a 0,01% e o controle com RPMI) foram cuidadosamente lavados em tampão fosfato (PBS) 0,1 M pH 7,4 e transferidos ao falcon onde foram sonicados. Foi adicionado 1 mL de uma solução de inibidores de protease (Aprotinina, Pepstatina, Leupeptina e E-64 [Sigma-Aldrich, EUA]) completando com glicerol q.s.p. 1% (v/v) e PBS para um volume final de 2 mL. A solução final foi processada em um sonicador VCX 130PB (SONICS & MATERIALS INC.) com probe CV 188 em uma amplitude de 50% por 4 vezes durante 20 segundos, deixando a amostra no gelo por 1 minuto entre cada intervalos. A cada troca de grupo a probe foi lavada sonicando PBS por 5 segundos. As amostras foram, então, centrifugadas por 3 min a 10.000 rpm, os precipitados ressuspensos e tanto os sobrenadantes quanto os

precipitados foram armazenados a -80°C aguardando as análises futuras.

5.4.2 Avaliação do grau de Peroxidação Lipídica

O Malondialdeído (MDA) é o um dos mais abundantes produtos de degradação resultante da peroxidação lipídica de ácidos graxos insaturados. Este aldeído foi quantificado pelo teste de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (ATB), com leitura do complexo formado em um fluorímetro (Cary Eclipse FL0906M002), com comprimento de onda de excitação e de emissão de 515 e 553 nm, respectivamente. A princípio foram elaboradas soluções padrão de 4,8, 9,6, 24, 48 e 96 μM de MDA e uma solução trabalho de ATB a 0,67% com ácido acético glacial q.s.p.. Para o preparo das soluções a serem medidas foram adicionados 300 μL da amostra/padrão, 250 μL de H_3PO_4 1,22 M, 200 μL de H_2O de Mili-Q e 250 μL da solução trabalho de ATB, e as soluções foram incubadas em banho-maria a 95°C por 1 hora. As soluções foram centrifugadas a 5.000 rpm por 5 min, coletando 333,33 μL do sobrenadante ao qual foram adicionados 600 μL de metanol (grau de pureza de CLAE) e 66,66 μL de NaOH 1 M. A solução foi filtrada e levada ao fluorímetro, sendo lida em quintuplicata (DAVEY et al., 2005; DRAPER; HADLEY, 1990). A curva de calibração foi analisada por regressão linear, onde as amostras foram plotadas e as concentrações obtidas foram normalizadas pelos resultados do item 5.4.2.

5.4.3 Quantificação das proteínas totais

O método utilizado neste trabalho para quantificar as proteínas totais encontradas nas amostras foi o de Bradford (1976) com as modificações de Zor e Selinger (1996). Esta é uma técnica colorimétrica que mede a interação do corante Cromassie Blue G-250 (Figura 6) com as proteínas da amostra.

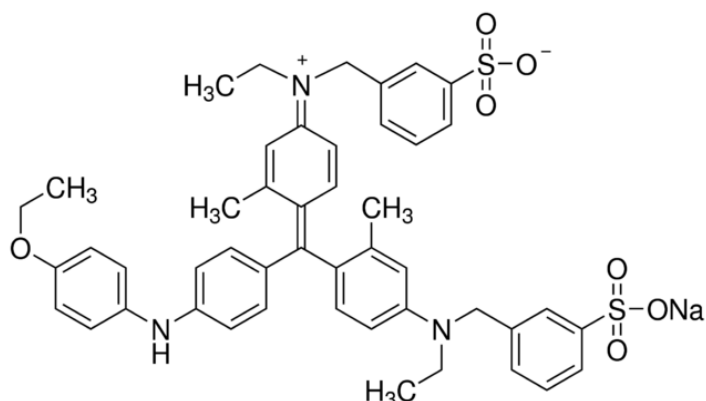


Figura 6 - Estrutura do Cromassie Blue G-250.
Fonte: Do autor.

No ambiente ácido em que a reação ocorre são 3 as formas encontradas do Cromassie: uma vermelha, uma azul e uma verde, com pico de absorbância em 470, 590 e 650 nm respectivamente. A forma vermelha se apresenta diprotonada e estável, enquanto a verde apresenta apenas um nitrogênio protonado e é mais instável. A forma azul se liga à proteína formando um complexo de absorção intensa a 594 nm. Esta interação ocorre por 2 fatores: a forma vermelha doa um elétron livre a um grupo ionizável da proteína, causando a desnaturação da mesma e fazendo com que ela exponha seus sítios hidrofóbicos. Estes sítios interagem com a porção apolar do corante por forças de Van der Waals (CHIAL; THOMPSON; SPLITTGERBER, 1993; COMPTON; JONES, 1985).

A solução de Cromassie Blue G-250 foi preparada de acordo com Bradford (1976). Após pesados em balança analítica, 100 mg do corante foram dissolvidas em 50 mL de etanol 95% e a solução foi submetida a agitação overnight. Foram adicionados 100 mL de ácido fosfórico 85% (p/v) e o volume foi completado para 1 litro com água deionizada bidestilada e filtrado 2x imediatamente. A solução foi então armazenada a 4°C e protegida da luz.

Foram preparadas soluções padrão de albumina bovina sérica (BSA), nas concentrações de 250, 200, 125, 100 e 50 µg/mL para a formação de uma curva de calibração.

Em uma placa de 96 poços foram adicionados 240 µL da solução de Cromassie preparada anteriormente e 10 µL de cada uma das soluções padrão e amostra. Cada teste foi feito em triplicata e a placa foi lida em colorímetro (Anthos Zenyth 200 RT). A curva de calibração foi analisada por regressão linear em um gráfico de concentração por absorbância no software Graphpad Prism (v 5.0) e as amostras foram interpoladas no eixo X para determinação de suas concentrações.

5.4.4 Atividade da SOD

A atividade da superóxido dismutase foi mensurada com um kit de ensaio de SOD (Sigma-Aldrich, EUA) que segue a metodologia de Peskin e Winterbourn (2000), a qual mede a interação do ânion superóxido (O_2^-) com o sal de formazano WST-1 (Water Soluble Tetrazólium-1), sendo este convertido em WST-formazan (Figura 7) e lido a 450 nm em leitor de microplaca de 96 poços.

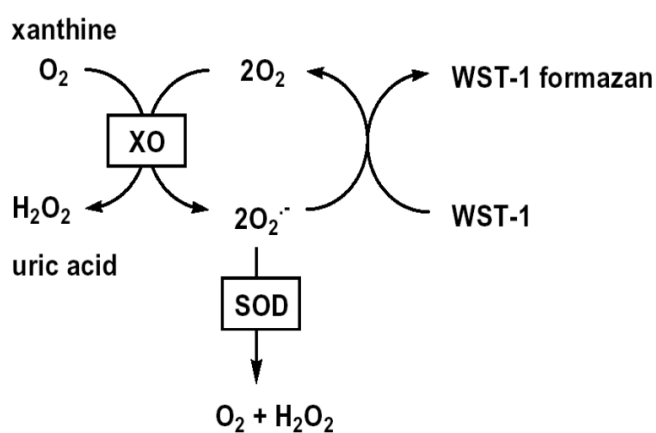


Figura 7 - Sistema de Xantina/Xantina Oxidase gerando O_2^- reduzindo o WST-1 para WST-formazan.

Fonte: Sigma-Aldrich (2015, p.1).

Para cada amostra foi realizada uma diluição seriada de 60, 50, 33, 25, 16,5 e 10%, e cada uma das diluições foi testada em triplicata, com o respectivo branco de amostra. Uma pipeta multicanal foi utilizada para adicionar a xantina oxidase simultaneamente no branco e nas amostras. Cada teste foi feito em triplicata e a placa foi lida em colorímetro (Anthos Zenyth 200 RT).

5.4.5 Cálculo da atividade de SOD em U/mg

A curva de calibração feita com BSA obtida na quantificação de proteínas foi analisada por regressão linear em um gráfico de concentração por absorbância no software Graphpad Prism (v 5.0) e as amostras foram interpoladas no eixo X para determinação da concentração das mesmas.

Os dados de cada grupo de amostras foram analisados, separadamente em gráficos de inibição da redução do WST-1 por fator de diluição. Os pontos de cada diluição foram interligados por fit spline/LOWESS point-to-point, fornecendo o fator de diluição de 50% de inibição. O fator de diluição obtido foi dividido pelo volume da amostra utilizado fornecendo as unidades por mL da amostra.

As unidades por mL divididas pelas respectivas concentrações de proteína forneceram os dados em unidades por mg de proteína.

5.5 DOCKING MOLECULAR

Os experimentos de *docking* foram feitos utilizando-se o programa AutoDock4, em conjunto com o programa AutoGrid4, que pré calcula mapas de potencial energético que serão usados no *docking*, reduzindo assim o tempo computacional; além dos *scripts* da suíte de programas MGLTools, cuja função é preparar os inputs para os programas citados acima (HUEY; MORRIS; FORLI, 2012).

Realizou-se *docking* molecular entre a SOD e a 7-epiclusianona com o objetivo de identificar possíveis formas de interação entre as duas moléculas e a energia de ligação entre as mesmas. A estrutura tridimensional da SOD foi obtida do PDB (Protein Data Bank) (BERMAN; HENRICK; NAKAMURA, 2003) (código PDB:1TO4, resolução: 1,55 Å), enquanto que a estrutura tridimensional da 7-epiclusianona foi obtida do PubChem (PubChem CID: 5471610) (KIM et al., 2016). A estrutura PDB escolhida para os experimentos de *docking* consiste em quatro cadeias proteicas idênticas (A, B, C e D) organizadas em dímeros (um dímero formado pelas cadeias A e B e outro pelas cadeias C e D). Cada monômero possui em seu sítio ativo um átomo de zinco com carga formal +2, e um átomo de cobre que apresenta duas localizações alternativas (coordenadas x, y e z), uma correspondente ao átomo de cobre com carga formal +1 e outra com carga +2. Foram realizados quatro experimentos de *docking*: um para o monômero (cadeia A) com átomo de cobre com carga +1, um para o monômero com átomo de cobre com carga +2, um para o dímero (cadeias A e B) com átomo de cobre com carga +1 e um para o dímero com átomo de cobre com carga +2. A seguir é apresentado o passo-a-passo de como o procedimento foi realizado por meio de linhas de comando em terminal virtual em sistema operacional Linux.

Inicialmente fez-se uma pré-edição manual no arquivo PDB do receptor (eliminação de

cadeias desnecessárias, eliminação de heteroátomos e moléculas de água, remoção de átomos com localização alternativa, seleção do átomo de cobre com a carga desejada, remoção das demais linhas do arquivo irrelevantes para o *docking*, como cabeçalho e comentários). Em seguida a estrutura do receptor foi preparada utilizando-se o *script* `prepare_receptor4.py` da suíte de programas MGLTools (todos os demais *scripts python* que se seguirem também pertencem ao MGLTools) por meio da seguinte linha de comando:

```
pythonsh prepare_receptor4.py -r receptor.pdb -A checkhydrogens -o SOD_CU.pdbqt
```

A preparação do receptor tem por finalidade adicionar átomos de hidrogênio e cargas elétricas aos átomos. Uma vez que o *script* por *default* não adiciona cargas a metais presentes no receptor, estas foram adicionadas manualmente (+2 para o zinco e +1 ou +2 para o cobre dependendo do caso). A preparação do ligante foi feita por meio da seguinte linha de comando:

```
pythonsh prepare_ligand4.py -l 7epi.mol2 -A bonds_hydrogens -o 7epi3D.pdbqt
```

A preparação do ligante visa adicionar átomos de hidrogênio, definir a carga dos átomos e selecionar as ligações químicas que terão liberdade de rotação. A próxima etapa foi gerar o arquivo *gpf* (*grid parameter file*) que por sua vez é *input* para rodar o programa `autogrid4`. O arquivo *gpf* define quais mapas de potencial serão gerados e quais as coordenadas do *gridbox* ou espaço de procura, região do espaço relativo ao receptor onde o programa buscará ancorar o ligante, geralmente englobando o sítio ativo. O centro do espaço de procura foi definido como o ponto médio entre os átomos de zinco e cobre, o espaçamento dos pontos de *grid* foram mantidos com o valor *default* de 0,375 Å, foram solicitados 60 pontos de *grid* em cada eixo coordenado:

```
pythonsh prepare_gpf4.py -l 7epi3D.pdbqt -r SOD_CU.pdbqt -o dock.gpf -p  
npts=60,60,60 -p gridcenter=14.605,-16.879,14.136 -p parameter_file=parametros.dat
```

Tendo-se o arquivo `dock.dpf` preparado, processou-se o `autogrid4`:

```
autogrid4 -p dock.gpf -l dock.glg
```

O programa autogrid4 gerou mapas de potencial eletrostático, de potencial de dessolvatação e os mapas de afinidade específica para os tipos de átomos presentes no ligante (carbono, carbono aromático, hidrogênio e oxigênio). A próxima etapa foi gerar o arquivo dpf (*docking parameter file*), definindo os parâmetros do *docking* (algoritmo de procura, número máximo de conformações do ligante para serem geradas, mapas de potencial que serão usados, etc), adotou-se os valores *default*:

```
pythonsh prepare_dpf42.py -l 7epi3D.pdbqt -r SOD_CU.pdbqt -o dock.dpf  
-p parameter_file=parametros.dat
```

Por fim processou-se o *docking* propriamente dito com o programa autodock4:

```
autodock4 -p dock.dpf -l dock.dlg
```

Uma vez que os parâmetros de para o átomo de cobre (raio de *van der Waals*, volume atômico, potencial *epsilon*, parâmetros de solvatação atômica, etc.) não estão definidos por *default*, utilizou-se um arquivo de parâmetros alternativo obtido do endereço eletrônico http://bioinf.modares.ac.ir/Courses/Docking/AD4_parameters.dat, que é adicionado pelo comando “-p parameter_file=parametros.dat” mostrado acima para a preparação dos arquivos gpf e dpf.

5.5.1 *Docking* molecular entre a SOD e a 7-epiclusianona em sítios alternativos

A fim de buscar possíveis formas alternativas de interação entre a SOD e a 7-epiclusianona, realizou-se *docking molecular* em novos sítios de ligação diferentes do sítio ativo. A busca por novos sítios foi feita com uso do programa AutoLigand (HARRIS; OLSON; GOODSELL, 2007) distribuído juntamente com o MGLTools. O programa AutoLigand utiliza mapas de potencial gerados pelo autogrid para encaixar átomos nas cavidades do receptor (átomos de carbono, hidrogênio ou oxigênio, de acordo com a hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade apresentada pela superfície proteica em questão), esses átomos são conectados, formando “pseudomoléculas”, e aquelas com volume razoável são selecionadas como

preenchendo cavidades onde poderia se ancorar uma pequena molécula. Foram identificados novos sítios de ligação para o monômero e para o dímero. A primeira etapa é preparar o arquivo `gpf` com a linha de comando:

```
pythonsh prepare_gpf4.py -l SOD.pdbqt -r SOD.pdbqt -o SOD.gpf
-p ligand_types='C,HD,OA' -p spacing='1.0' -y
```

Utiliza-se a estrutura da proteína tanto como receptor quanto como ligante, o espaçamento de pontos de grid é redefinido para 1 Å, o espaço de procura fica centrado no receptor com pontos de grid em cada eixo coordenado suficientes para englobar toda a proteína. O autogrid é rodado em seguida:

```
autogrid4 -p SOD.gpf -l SOD.glg
```

Por fim processou-se o AutoLigand:

```
pythonsh AutoLigand.py -r SOD -p 90
```

A saída do programa `AutoLigand.py` é um conjunto de “pseudomoléculas” formadas por átomos de carbono, oxigênio e hidrogênio que preenchem as cavidades localizadas. Por meio de um *script perl* calculou-se o centro de massa dessas pseudomoléculas para serem utilizados como centro dos espaços de procura, salvando-os em arquivo de texto, conforme o Quadro 1.

Quadro 1 – Centro de sítios de ligação alternativos localizados pelo programa AutoLigand.

gridcenters na estrutura monomérica	
1 =	35.007,6.062,3.082
2 =	30.507,24.062,-1.418
3 =	18.507,21.062,6.582
4 =	24.507,13.562,-8.918
5 =	27.007,14.062,-7.418
6 =	10.007,7.062,8.082
7 =	19.507,14.562,8.582
8 =	25.007,-3.938,-1.918
9 =	3.507,4.562,-6.918

Fonte: Do autor.

As etapas para realizar o *docking* foram as mesmas descritas na seção anterior, escreveu-se um *shellscript* para ler o arquivo contendo os centros dos sítios de ligação e realizar os cálculos de forma automática, conforme o Quadro 2.

Quadro 2 – Script utilizado que direciona o docking em sítios alternativos.

```

Shellsript para rodar o docking molecular em sítios alternativos

#!/bin/bash

# diretório dos scripts MGLTools
scr_dir="/usr/local/MGLToolsPkgs/AutoDockTools/Utilities24/"

receptor=$1 # receptor em formato pdbqt
ligante=$2 # ligante em formato pdbqt
caixas=$3 # arquivo de texto contendo o centro das caixas de docking

index=1 # índice para as diferentes caixas de docking

while read center
do
    mkdir $(basename $PWD)_${index}
    cd $(basename $PWD)_${index}

    # gerar o arquivo gpf
    pythonsh ${scr_dir}prepare_gpf4.py -l ../$ligante -r ../$receptor -p $center -p
receptor=../$receptor -o dock.gpf

    # rodar o autogrid
    autogrid4 -p dock.gpf -l dock.glg

    # gerar o arquivo dpf
    pythonsh ${scr_dir}prepare_dp42.py -l ../$ligante -r ../$receptor -p move=../$ligante -o
dock.dpf

    # rodar o autodock
    autodock4 -p dock.dpf -l dock.dlg

    # gerar as poses em formato pdb
    mkdir poses_pdb
    pythonsh ${scr_dir}write_conformations_from_dlg.py -d dock.dlg -o ./poses_pdb/pose_

    for lig in $(ls ./poses_pdb)
    do
        obabel -ipdbqt ./poses_pdb/${lig} -O ./poses_pdb/${(basename $lig .pdbqt)}.pdb
    done

    cd ..
    index=$((index + 1)) # incrementar o índice para a próxima caixa

done < $caixas

exit

```

Fonte: Do autor.

5.6 AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO DO RNAm CODIFICADOR DA SOD

A forma de indução de contato do parasito com a droga foi semelhante à do item 5.4.1 (p. 34).

5.6.1 Obtenção e tratamento do parasitos

Uma placa de 24 poços foi dividida 8 grupos, referentes às concentrações de 100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ de 7-epiclusianona em Kolliphor[®] EL 0,01%, um grupo para o veículo, um grupo com PZQ (2 $\mu\text{g/mL}$) e um com apenas RPMI. Os parasitos, retirados conforme item 5.3, ficaram em contato com os compostos por 24 h, sendo retirados do meio e armazenados em um eppendorf a -20°C até o momento da extração.

5.6.2 Extração do RNA

A extração foi realizada através do protocolo do kit Ambion (PureLink RNA Mini Kit – Ref 12183025). As amostras foram maceradas ainda congeladas e tratadas com 2-mercaptoetanol e tampão de lise. A solução então é filtrada em uma membrana de troca iônica, na qual o RNA fica retido. Após a lavagem desta membrana com tampões de purificação, o RNA é eluído em água e armazenado

5.6.3 Conversão para cDNA

Foram preparados dois mix, no mix I foram adicionados 1 μL de desoxirribonucleotídeos trifosfatados (DNTPs) (Invitrogen – Código 10297-018) e 1 μL de random primers (Invitrogen – Código 48190-011); e no mix II foram adicionados 2 μL de Ditioneitol (DTT), 4 μL de tampão e 1 μL de MMLV-RT (Invitrogen – Código 28025013). Em cada vial de amostras

adicionaram-se 10 µL da respectiva amostra e 2 µL do mix I, sendo estes levados ao termociclador (GeneAmp PCR System 9700) por 5 min a 65°C. Após esse tempo, foram adicionados 7 µL do mix II a cada vial, completando o ciclo com 50 minutos a 37 °C, finalizando com fase de 95 °C por 5 minutos, até a retirada e armazenamento do cDNA.

5.6.4 Desenho dos primers

A especificidade e a eficiência do primer são duas características que influenciam diretamente na qualidade de uma Reação em Cadeia da Polimerase. A especificidade influi a capacidade do primer de amplificar apenas o fragmento desejado enquanto a eficiência diz respeito à capacidade do mesmo de atingir a estimativa teórica de dobrar a quantidade de material a cada ciclo. Características do primer como número de nucleotídeos, conteúdo de guanina/citosina (que caracteriza a temperatura de anelamento) e ausência de compatibilidades entre nucleotídeos influenciam diretamente na eficiência e especificidade do mesmo (DIEFFENBACH; LOWE; DVEKSLER, 1993; THORNTON; BASU, 2011; WROBEL; KOKOCINSKI; LICHTER, 2004; YE, J. et al., 2012; YURYEV, 2015). Uma forma de aumentar a credibilidade de uma análise quantitativa comparativa por qPCR com SYBR é utilizar um gene normalizador (KOZERA; RAPACZ, 2013; LIU et al., 2012) e o mRNA de escolha foi o da actina (ACT) (GenBank: U19945.1). Dez propostas de *primers* foram desenhadas pela ferramenta *Primer BLAST* (NCBI) e os oligonucleotídeos selecionados foram ACG TCG GTG ATG AAG CAC AA (*foward*) e CAT CGG GTC GTA CAA CTG GT (*reverse*) (Exxtend, BRA). Os *primers* da SOD também foram propostos pelo Primer BLAST, desenhados à partir do mRNA da Cu/Zn SOD de *S. mansoni* (GenBank: Q01137.1), sendo escolhidos os oligonucleotídeos GAC TGG TAC AGC TGG CGT AA (*foward*) e GAT TTA GGC CGT GGT GGT CA (*reverse*) (Exxtend, BRA).

5.6.5 qPCR

Os *primers* da SOD (*foward* e *reverse*) liofilizados foram solubilizados nas concentrações de 100 µM para armazenamento e utilizados nas reações nas concentrações de 2

μM . Cada amostra foi analisada em duplicata, onde no primeiro poço foram utilizados os primers da SOD e em outro, os da ACT e analisadas de forma comparativa (ΔCt). Cada poço possui 10 μL de volume final, sendo 5 μL de SYBR Green I[®] (Applied Biosystems do Brasil – Cód. 4367659), 2 μL de H₂O (RNase free), 2 μL de *primer* (1 μL de forward e 1 μL de reverse) e 1 μL de cDNA (H₂O RNase free no caso dos controles negativos). A reação foi levada ao StepOne Real Time PCR Systems (Ref: 4369074 - Life Technologies) submetido à 40 ciclos de 95>60>95°C com montagem da *melting* curve ao final do processo, iniciada a 60°C e com leitura a cada 0,3°C até atingir 95 °C.

5.6.6 Análise comparativa da expressão

Os dados obtidos foram analisados com auxílio do software Graphpad Prism (v5.0). Os Cts obtidos no StepOne Software (v2.3) foram convertidos em um gráfico de análise agrupado em barras intercaladas de SOD e ACT. Outro gráfico criado foi o de análise relativa (ΔCt), onde se subtraiu o Ct do normalizador (ACT) do Ct do alvo (SOD).

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Castro et al. (2015a) mostraram que a 7-epiclusianona apresenta atividade esquistossomicida no modelo *ex vivo*, mas não avaliaram os possíveis mecanismos de ação do composto em termos bioquímicos e moleculares. A descrição de como uma droga atua direciona o tratamento e permite avaliar a sua seletividade, auxiliando na detecção de efeitos colaterais. Considerando a atividade esquistossomicida da 7-epi, o presente estudo buscou elucidar potenciais alvos sobre os quais o composto atua. Tendo em vista a importância dos mecanismos de detoxificação das espécies reativas na manutenção do estresse oxidativo, e consequente aumento da longevidade do parasito, foram analisadas a ação da 7-epi no contexto *ex vivo* tanto na peroxidação lipídica quanto na atividade da SOD parasitária após a ação do composto sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Além disto, foi feita uma investigação em nível de expressão da enzima SOD do parasito, quantificando o RNAm após ação da 7-epi também neste contexto. Complementarmente, foi feita uma análise *in silico* para avaliar a forma de interação do composto com a enzima.

Para o isolamento da 7-epi foram montadas quatro colunas preparativas, sendo duas com extrato hexânico do epicarpo de *Rheedia brasiliensis* (31,5 e 31,8g de extrato respectivamente) e duas com extrato etanólico do epicarpo de *R. brasiliensis* (20,1 e 20,6g de extrato respectivamente). Durante a recristalização foi possível separar os cristais esverdeados da 7-epi. Estes cristais foram submetidos ao processo de recristalização novamente, e sua pureza (>99%) foi confirmada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Figura 8) em C₁₈ Acqua (150,0 x 4,6 d.i.) mm 125 Å 5 µm (Phenomenex[®]) e fase móvel de metanol/ácido acético 0,2% (95:5) com volume de injeção de 100µL, fluxo de 1,2 mL/min, pressão de 94 kgf/cm² e sendo detectado no ultravioleta a 245nm.

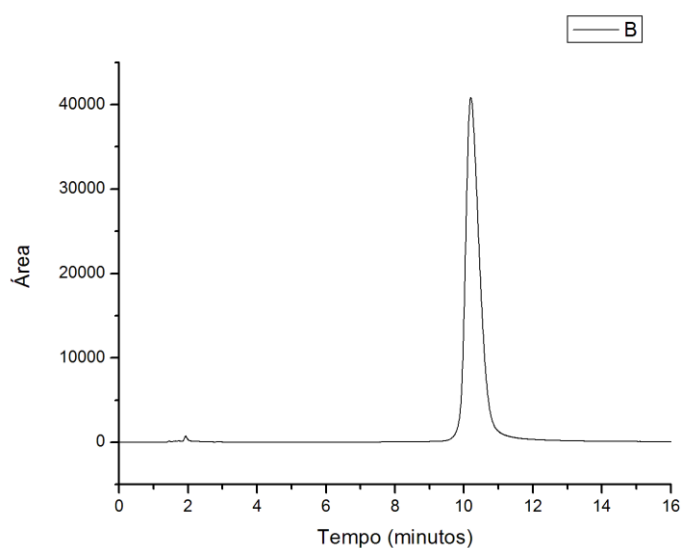


Figura 8 - Cromatografia líquida de alta eficiência da amostragem de 7-epiclusianona após a segunda recristalização comprovando o grau de pureza superior a 99,0%. O pequeno pico encontrado em aproximadamente 2 minutos de corrida refere-se ao solvente utilizado na corrida.

Fonte: Do autor.

A corrida durou 16 minutos e o pico da 7-epi pôde ser observado entre 10 e 11 minutos de corrida. Nas quatro colunas obteve-se um total de 16,75g de 7-epi com o mesmo grau de pureza dos trabalhos de Santos et al. (1999) e Castro et al. (2015a).

Castro et al. (2015) já mostraram a eficácia da 7-epi mesmo em pequenas doses, com base em análises de sobrevivência, movimentação, acasalamento, postura de ovos, danos no tegumento e no sistema digestório. No trabalho em questão foi observado que a 13,4µg/mL de 7-epi 90% da população foi morta (EC_{90}) e a 8,3 µg/mL 50% dos mesmos também foram levados a óbito. Todavia, Castro et al. (2015a) utilizaram como veículo o metanol a 1% durante os ensaios. Este solvente apresentou forte impacto sobre a atividade da SOD, fazendo-se necessária a substituição do veículo para o Kolliphor[®] 0,01%, um veículo por natureza menos agressivo para a enzima (dados não mostrados). Esta modificação demandou uma repetição do teste parasitológico para analisar se esse veículo, isoladamente, apresentaria ação sobre os parasitos. Os resultados obtidos nas análises parasitológicas estão na

Tabela 1, onde foi possível observar apenas um leve impacto na movimentação do sistema digestório com o Kolliphor[®] quando comparado ao grupo RPMI-1640. Os resultados referentes às diferentes concentrações de 7-epi se mantiveram consistentes com os encontrados por Castro et al. (2015a), mostrando também que não ocorre efeito sinérgico entre o veículo e

o composto. No entanto, houve um impacto significativo do veículo sobre a oviposição, a qual foi numericamente reduzida e teve início latente na presença do Kolliphor® (Tabela 2).

Tabela 1 - Análise de motilidade, funcionamento do sistema digestivo e danos no tegumento dos parasitos.

Grupo	Movimento				Sistema Digestivo				Danos no Tegumento			
	Em contato		Após o contato		Em contato		Após o contato		Em contato		Após o contato	
	2h	24h	2 dias	7 dias	2h	24h	2 dias	7 dias	2h	24h	2 dias	7 dias
RPMI-1640	+/											
	+	+/+	+/+	+/+	+	+	+	+	-/-	-/-	-/-	-/-
PZQ	---											
	/x	x/x	x/x	---/x	x	x	x	X	-/-	-/BD	DB/DB	D/D
7-epi 50 µg/mL	+/											
	+	+/--	--/x	---/x	-	x	x	X	/B	-/BD	DB/DB	D/DB
7-epi 25 µg/mL	+/											
	+	+/--	--/---	-/x	-	x	x	X	/B	B/B	DB/DB	D/D
7-epi 12,5 µg/mL	+/											
	+	+/--	---/---	---/x	-	--	x	--	/B	B/B	B/DB	-/DB
7-epi 6,25 µg/mL	+/											
	+	+/+	-/+	+/+	-	--	+	+	-/-	-/-	-/-	-/-
7-epi 3,125 µg/mL	+/											
	+	-/-	+/+	+/+	+	-	+	+	-/-	-/-	-/-	-/-
Kolliphor® 0,01%	+/											
	+	+/+	+/+	+/+	+	-	+	+	-/-	-/-	-/-	-/-

Fonte: Do autor

Legenda: Movimento - (f/m) + movimento normal, - reduzido, -- espasmódico, x ausente. Sistema digestivo - + normal, - movimento reduzido, -- movimento e conteúdo reduzidos, x parado. Danos no tegumento - (f/m) - normal, B bolhas, D desprendimento, BD bolhas e desprendimento.

Nota: Após 24h de contato com o Kolliphor®, os parasitos apresentaram motilidade reduzida do sistema digestivo, a qual se normaliza após a retirada do composto. É possível observar danos no tegumento do parasito em concentrações à partir de 12,5 µg/mL. A ausência de motilidade no sétimo dia representa o falecimento do helminto.

Tabela 2 - Análise quantitativa da oviposição durante os 8 dias de avaliação do novo veículo.

Grupo	Oviposição							
	Em contato		Após o contato					
	2h	24h	2 dias	3 dias	4 dias	5 dias	6 dias	7 dias
RPMI	0	20	161	335	361,3	419	479,3	527,3
6,25 µg/mL	0	34	211	333	340	391,5	412,5	407
Kolliphor®	0	0	192	253	298	355	376	461

Fonte: Do autor

Nota: Foram colocados apenas um casal por poço, e a contagem é cumulativa. A concentração de 7-epi de 6,25 µg/mL foi escolhida para esta comparação por ser a maior concentração do composto onde ainda se observa a oviposição. O início do processo fase foi tardio na presença do Kolliphor® quando comparado ao RPMI e ao grupo de 6,25 µg/mL., e a contagem final foi menor quando comparada ao RPMI-1640. A contagem final dos ovos mostra que o Kolliphor® apresenta um valor inferior ao do controle RPMI-1640, salientando que o veículo ocasiona uma pequena redução quantitativa na oviposição.

Qualitativamente, os ovos apresentaram aparência danificada (Figura 9), diferentemente do que foi observado quando se utilizou o metanol como veículo. Provavelmente, os ovos apresentam na estrutura da casca algum componente químico que interage com veículo.

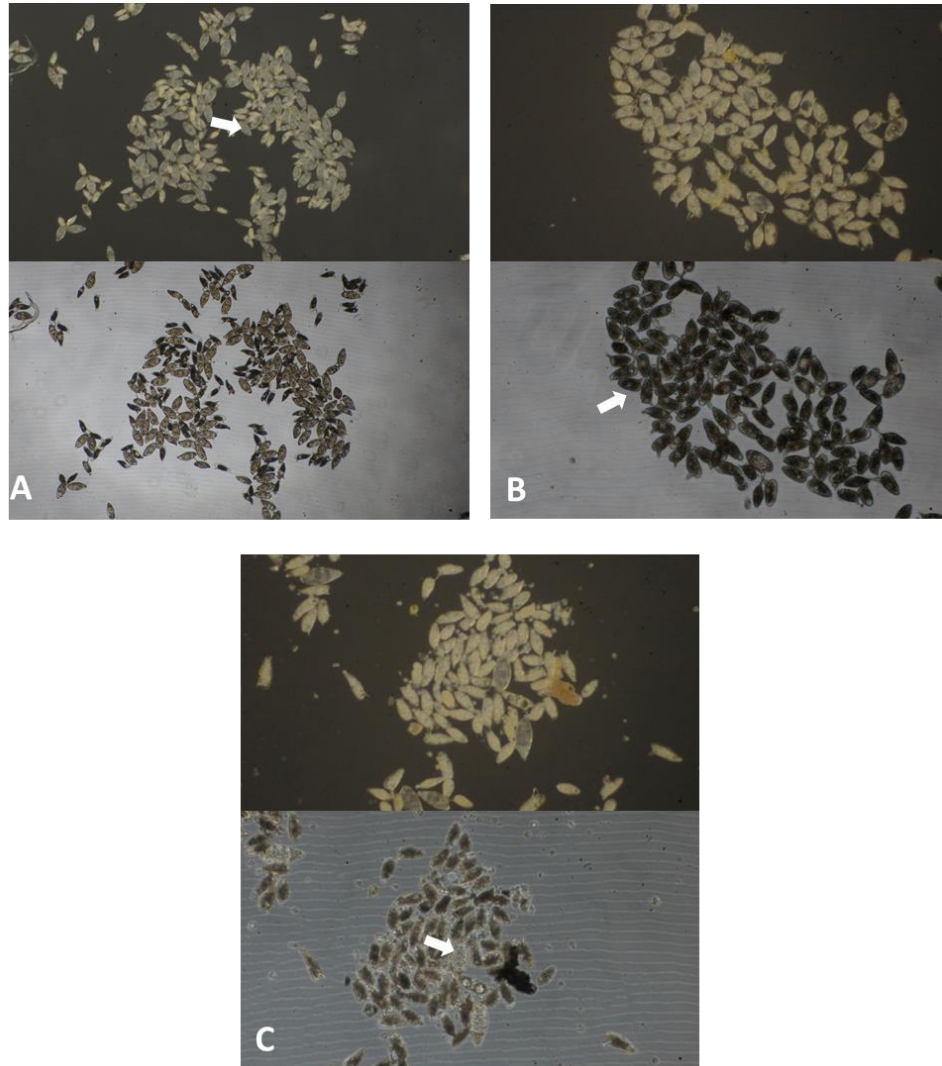


Figura 9 - Ovos encontrados no sexto dia após a retirada dos compostos.

Fonte: Do autor.

Legenda: A: Ovos do controle RPMI-1640, onde se é possível ver ovos no último estágio evolutivo, prestes a eclodir; B: Ovos referentes à concentração de 6,25 µg/mL de 7-epiclusianona, se mostrando escurecidos, com maturação retardada; C: Ovos do Kolliphor®, com uma aparência “lustrada” e maturação retardada.

Usando o Kolliphor® como veículo, os ED₉₀ e ED₅₀ da 7-epi sobre vermes adultos de *S. mansoni* resultaram em 13,08 e 7,027 µg/mL, respectivamente, e ambos com R²= 0,9819. A pequena diferença encontrada em relação aos valores determinados no trabalho de Castro et al. (2015a) (13,4 e 8,3 µg/mL) reforça que não ocorre efeito sinérgico entre o veículo e o composto. O grupo de Stokes et al. (2013) mostra a baixa citotoxicidade deste veículo em outros modelos

animais provando que mesmo em doses muito superiores à utilizada neste trabalho ele é considerado um veículo seguro. Adicionalmente, o Kolliphor® teve um impacto sobre a atividade da enzima superóxido dismutase, usada no processo de detoxificação do parasito, porém inferior à do metanol.

O *S. mansoni* desenvolveu mecanismos para se defender da resposta imune, aumentando a longevidade tanto do próprio parasito quanto do hospedeiro (HONG; KOSMAN; THAKUR, 1992; VAN HELLEMOND et al., 2006). Parte destes recursos está associada à estrutura do tegumento, o qual secreta e/ou expõe substâncias que influenciam na resposta do hospedeiro. No entanto, esta barreira do parasito não é impenetrável, e ocasionalmente, o trematódeo pode sofrer ação de espécies reativas capazes de causar danos oxidativos.

A peroxidação lipídica é um fenômeno que depende da presença de espécies reativas para que a reação seja iniciada e mantida (MANTAWY, M M et al., 2012) e sua análise em um determinado ambiente pode contribuir para uma avaliação indireta do nível de estresse oxidativo presente no meio em questão (HOULT; PAYÁ, 1996; LEE et al., 2005; SAYED; COOK; WILLIAMS, 2006; OLIVEIRA et al., 2013). Há vários trabalhos que avaliam a alteração dos níveis de peróxido lipídico em mamíferos infectados com *S. mansoni* e/ou tratados com diferentes compostos (MANTAWI et al. 2012; AZIZ et al., 2015; JATSA et al., 2016). Mas Filadelfo (2009) observou um aumento da peroxidação lipídica, usando TBARS, diretamente em vermes adultos de *S. mansoni* após tratamentos com drogas isoladas ou em associação. Desta forma, foram montados grupos de 40 casais de helmintos adultos, submetidos a contato com a 7-epi a 50, 25 e 12,5 µg/mL. Foram utilizados como controle o Kolliphor® a 0,01% e o RPMI-1640. Após 24 h de contato com o composto, os grupos foram lisados e centrifugados, sendo separados os sobrenadantes e precipitados destas amostras para quantificação do Malondialdeído.

Os resultados obtidos dos sobrenadantes e precipitados de cada grupo foram analisados tanto individualmente quanto agrupados, pelo teste de one-way ANOVA com *post hoc* tukey's test ($p < 0,01$ e $0,001$). Nas comparações com $p < 0,01$ todos os grupos apresentaram diferença estatística significativa entre si, tanto nas análises individuais quanto na grupada. Com $p < 0,001$ os únicos casos em que não se observou diferença estatística significativa entre si foram os sobrenadantes dos grupos 12,5 µg/mL e Kolliphor® (Figura 10); os precipitados de 50 e 25 µg/mL (Figura 11); e na análise grupada os grupos de 25 µg/mL e Kolliphor® (Figura 12).

A avaliação indireta da presença de espécies reativas pela quantificação da peroxidação lipídica por titulação do MDA revelou mais um impacto do Kolliphor® sobre os parasitos,

mostrando que na presença do veículo a concentração deste marcador de peroxidação chega a dobrar. Na dose de 12,5 µg/mL a 7-epi apresenta um efeito significativamente menor que o do veículo, reduzindo ou não interferindo no aumento do grau da peroxidação lipídica. Este fato permite especular sobre uma baixa capacidade antioxidante da 7-epi. Em contrapartida, Santa-Cecília et al.(2012) afirmaram que a 7-epi não mostrou atividade antioxidante considerável nos testes de *scavenging* de radicais livres do DPPH e de potenciais de redução e quelante. Outro fato que foi possível observar é que em doses superiores a 50µg/mL o grau de peroxidação lipídica estava superior aos outros grupos, mostrando que em doses muito altas a 7-epi é capaz de induzir um forte estresse oxidativo no trematódeo.

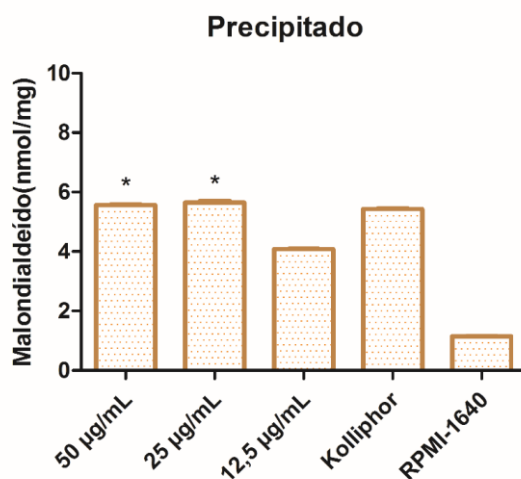


Figura 10 - Análise das concentrações de malondialdeído presentes nos precipitados das amostras. (*) Dados que não apresentaram diferença estatística significativa com $p < 0,001$.

Fonte: Do autor.

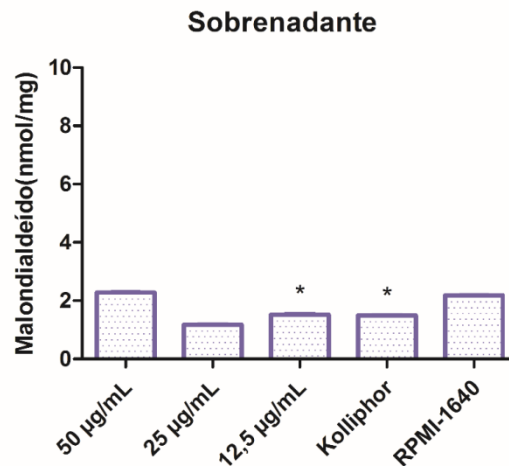


Figura 11 - Análise das concentrações de MDA presentes nos sobrenadantes das amostras. (*) Dados que não apresentaram diferença estatística significativa com $p < 0,001$.

Fonte: Do autor.

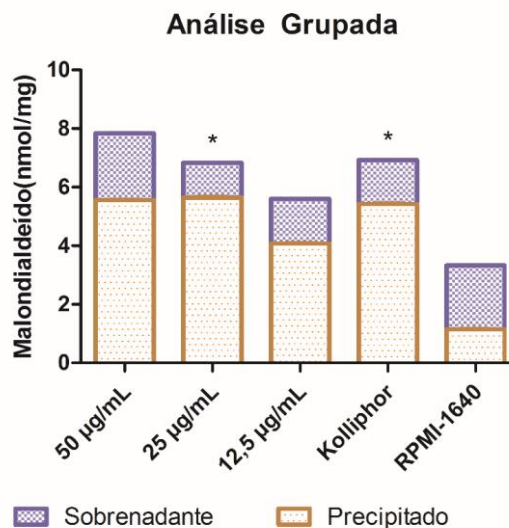


Figura 12 - Análise das concentrações somadas de MDA. (*) Dados que não apresentaram diferença estatística significativa com $p < 0,001$.

Fonte: Do autor.

Devido à predominância da resposta Th2 na fase crônica, para este estudo foi escolhida a enzima superóxido dismutase que detoxifica um dos principais EROs que entra em contato com o parasito, o ânion superóxido (CALLAHAN; CROUCH; JAMES, 1988; HONG; KOSMAN; THAKUR, 1992; MAIZELS et al., 1993). Na manutenção dos níveis de O_2^- se faz necessária a SOD, uma metaloenzima ubíqua capaz de acelerar a conversão de superóxido para peróxido de hidrogênio. Esta enzima é a única presente no parasito que efetua a detoxificação do superóxido, tornando-a um alvo interessante para o trabalho.

Para tanto, foram montados três grupos de 40 casais de parasitos adultos cada, submetidos a contato com a 7-epi a 50, 25 e 12,5 µg/mL. Foram utilizados como controle o Kolliphor[®] e o RPMI. Após 24 h de contato com a droga, os grupos foram lisados e os sobrenadantes desses lisados foram utilizados na avaliação de atividade da SOD. Os resultados foram expressos com as médias e os desvios das médias. As diferenças entre os grupos foram analisadas pela técnica de one-way ANOVA com *post hoc* tukey's test ($p < 0,01$ e $0,001$).

O resultado mostra que o veículo age sobre a superóxido dismutase, mas é possível observar o efeito do composto (Figura 13). Os grupos de 50 e 25 µg/mL não apresentaram diferença estatística considerável entre si, mas apresentam diferença do grupo 12,5 µg/mL ($p < 0,01$). É possível distinguir estatisticamente o grupo 12,5 µg/mL do Kolliphor[®] ($p < 0,001$), lembrando que nessa dosagem os danos no tegumento se apresentaram intensos. A redução de atividade observada é de aproximadamente 30% do total em relação ao Kolliphor[®] e a dose está muito próxima do ED₉₀ (13,08 µg/mL). Este fato condiz com uma participação coadjuvante deste mecanismo na letalidade da 7-epi sobre o parasito.

A superóxido dismutase já foi usada como antígeno vacinal no trabalho de Shalaby et al. (2003), dada sua importância nos mecanismos de detoxificação do parasito. Este déficit na detoxificação do superóxido favorece o aumento do fluxo da reação de Haber-Weiss, intensificando a produção do radical hidroxil, altamente danoso aos componentes celulares. O dano inicial causado por estas espécies expõe os tecidos mais profundos do parasito, os quais não contam com o mimetismo, sendo mais susceptíveis ao reconhecimento de antígenos, formação de complemento e aderência de granulócitos. Logo, este resultado permite associar a formação de bolhas e desprendimento do tegumento encontrados em doses acima de 12,5 µg/mL com a redução de atividade da SOD (Figura 14). É válido ressaltar que a inibição não se apresenta proporcional à concentração, propiciando a hipótese de inibição alostérica.

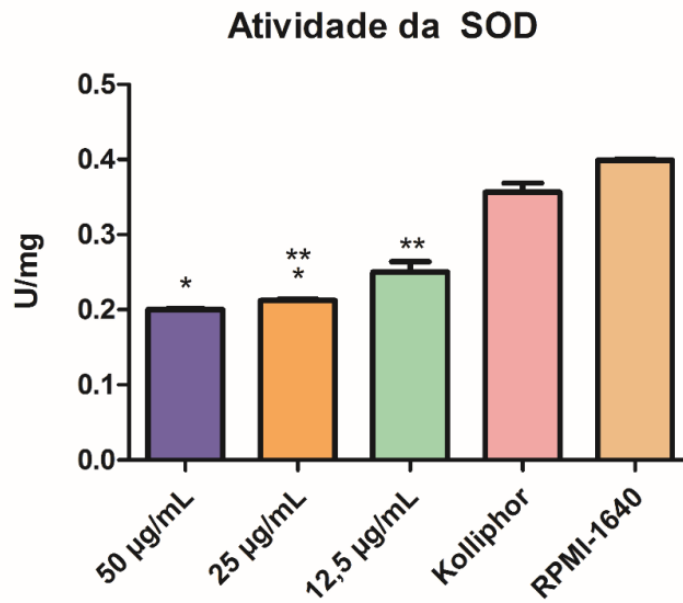


Figura 13 - Atividade de SOD presente no sobrenadante do homogenato de *S. mansoni*, dada em unidades por mg de proteína presente na amostra. (*) Grupos que não apresentaram diferença estatística significativa com $p < 0,01$. (**) Grupos que não apresentaram diferença estatística significativa com $p < 0,001$.

Fonte: Do autor.

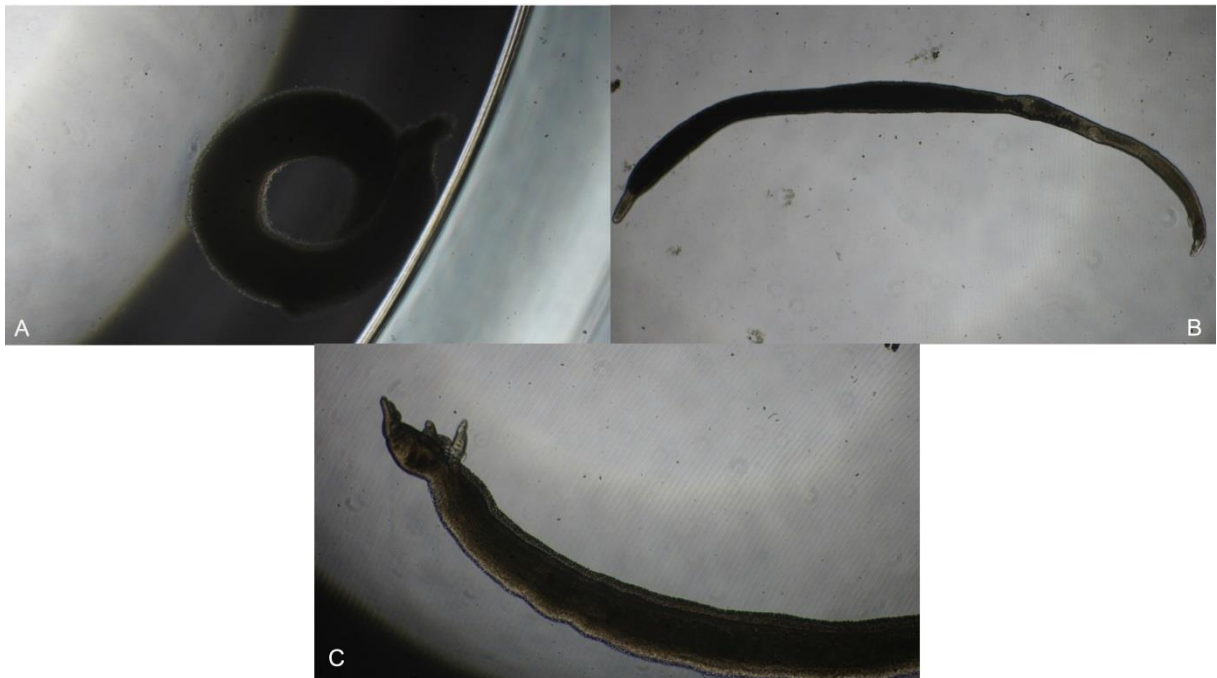


Figura 14 – Oitavo dia do teste parasitológico. A: Fêmea do grupo 12,5 µg/mL com o tegumento já desprendido; B: Macho do grupo 12,5 µg/mL com o tegumento ainda sendo desprendido; C: Casal do grupo RPMI-1640 com o tegumento intacto.

Fonte: Do autor.

Com o objetivo de melhor compreender a interação entre a 7-epi e a enzima foram

executados ensaios de *Docking* molecular, um método computacional cujo objetivo é prever o complexo resultante da interação entre uma proteína e uma pequena molécula, podendo esta ser um substrato, cofator ou inibidor. Para se rodar o *docking* é necessário possuir a estrutura tridimensional da proteína determinada seja por cristalografia de raio-X ou NMR, e também a estrutura tridimensional da pequena molécula, que pode ser obtida pelos mesmos meios ou modelada por um programa de computador (MUKESH; RAKESH, 2011).

O programa de *docking* procura pela melhor orientação relativa entre o receptor e o ligante, a chamada pose, em outras palavras, qual seria a forma que o ligante se encaixaria no sítio ativo do receptor. Para isso, se utiliza de algoritmos de procura, gerando um conjunto significativo de diferentes conformações do ligante em um período de tempo viável. O AutoDock4 é um programa que utiliza a metodologia rígido-flexível, na qual a proteína, chamada receptor, é considerada como sendo um corpo rígido, possuindo apenas liberdades de rotação e translação, enquanto que a pequena molécula, chamada ligante, além das liberdades de rotação e translação, possui liberdades de torção, gerando diferentes conformações para a mesma molécula (MENG et al., 2011). Dentre os algoritmos de procura utilizados pelo AutoDock4 tem-se o Monte Carlo e o LGA (*Lamarckian genetic algorithm*) (MUKESH; RAKESH, 2011). A escolha da melhor pose é feita por meio de uma função de *score*, que calcula a energia de interação entre as duas moléculas, levando em consideração energias de van der Waals, interações de hidrogênio, energias eletrostáticas, de dessolvatação e torcional. A função de *score* usada pelo AutoDock4 possui a seguinte forma geral:

$$\begin{aligned} \Delta G = & \Delta G_{\text{vdW}} \sum_{i,j} \left(\frac{A_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{B_{ij}}{r_{ij}^6} \right) \\ & + \Delta G_{\text{hbond}} \sum_{i,j} E(t) \left(\frac{C_{ij}}{r_{ij}^{12}} - \frac{D_{ij}}{r_{ij}^{10}} + E_{\text{hbond}} \right) \\ & + \Delta G_{\text{elec}} \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon(r_{ij}) r_{ij}} \\ & + \Delta G_{\text{tor}} N_{\text{tor}} \\ & + \Delta G_{\text{sol}} \sum_{i_c, j} S_i V_j e^{(-r_{ij}^2 / 2\sigma^2)} \end{aligned}$$

Figura 15 – Função de *score* utilizada pelo AutoDock4.
Fonte: Do autor.

Na função da Figura 15, cada termo parcial de ΔG (ΔG_{vdW} , ΔG_{hbond} , etc) possui por sua vez uma fórmula empírica própria (não mostradas) cujos termos são multiplicados por

coeficientes calibrados por análise de regressão linear de complexos proteína-ligante de estruturas tridimensionais experimentalmente determinadas cujas energias livre de ligação são conhecidas (MORRIS et al., 2009).

Já existem diversos usos de ferramentas computacionais em pesquisas que envolvem o *S. mansoni*, como exemplo na elucidação de estruturas presentes no transcriptoma do trematódeo (FERREIRA; OLIVA; ANDRICOPULO, 2015; LEOW et al., 2015), permitindo detecção de alvos para protótipos de vacinas (PINHEIRO et al., 2011) e testes de *docking* avaliando possíveis ligantes com atividade inibitória sobre enzimas fundamentais ao parasito (GABA et al., 2014). O modelo descrito por Cardoso et al. (2004) possibilita a avaliação da interação da 7-epiclusionona com a forma citosólica da SOD pelo *docking* molecular. Desta forma, o fato da redução de atividade da enzima necessitar de concentrações mais altas de 7-epi que as usadas nos testes parasitológicos estimularam uma análise *in silico* para compreender melhor a interação entre o composto e a enzima.

As energias de interação entre a SOD e a 7-epiclusionona com espaço de procura centrado no sítio ativo para o monômero e para o dímero estão apresentadas na Tabela 3. A título de comparação, processou-se também o *docking* com a proteína SOD sem a presença dos metais cobre e zinco em seu sítio ativo.

Tabela 3 – Energias de interação entre a SOD e a 7-epiclusionona no sítio ativo

Receptor	Centro da caixa (x, y, z, em Å)	Energia (kcal/mol)
Monômero Cu ⁺	20.193, 17.195, 3.056	-4.07
Monômero Cu ²⁺	20.193, 17.195, 3.056	-3.06
Dímero Cu ⁺	14.605, -16.879, 14.136	-2.39
Dímero Cu ²⁺	14.605, -16.879, 14.136	-2.66

Fonte: Do autor

Pela simulação de *docking* na forma monomérica com o íon de cobre na forma +1 percebe-se que o ligante interage com os resíduos His47, Thr57, Gli60, Ala61, His62, His79, His119, Leu132, Val135, Thr136, Ala139, Gli140 e Arg142 (Figuras 16 e 17), mas a baixa variação empírica (Tabela 3) sugere que a 7-epiclusionona possui volume maior que o sítio ativo e assim não consegue adentrar no mesmo, podendo talvez exercer inibição alostérica ao bloquear a entrada do sítio ativo, embora seja pouco provável. Outra observação a ser feita é que o sítio ativo apresenta certo grau de hidrofobicidade, devido à presença de resíduos

carregados como histidina e ácido aspártico, enquanto que a 7-epiclusianona tem caráter mais apolar, devido a anéis aromáticos presentes em sua estrutura, o que pode contribuir a menor afinidade observada. A presença do átomo de cobre na forma +1 ou +2, ou mesmo a ausência dos metais praticamente não afetou os resultados, visto que o ligante não interage com estes íons, e as pequenas variações entre os valores de energia pode se dever a efeitos aleatórios em virtude do algoritmo de procura utilizado.

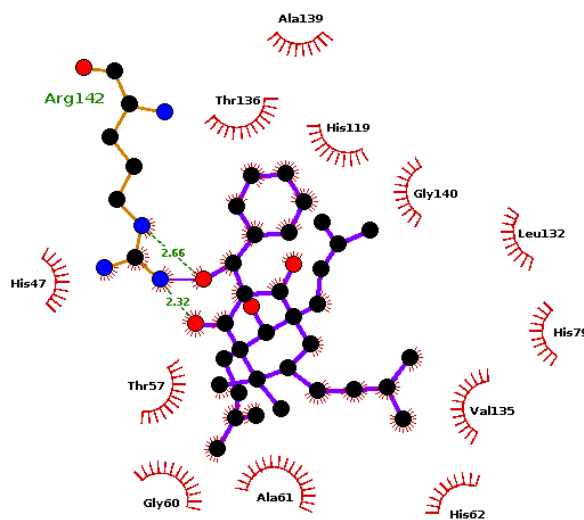


Figura 16 – Representação gráfica da interação entre a 7-epiclusianona e a SOD monomérica com o íon de cobre na forma +1, calculada por experimento de docking. Gráfico plotado pelo programa ligplot. Os arcos vermelhos representam interações hidrofóbicas e os tracejados verdes pontes de hidrogênio.

Fonte: Do autor.

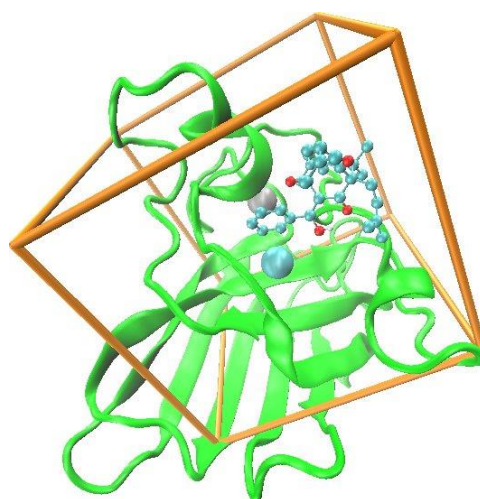


Figura 17– Conformação de interação entre a 7-epiclusianona(ciano) e a SOD monomérica(verde) com o íon de cobre(ciano) na forma +1, calculado por experimento de docking. Imagem renderizada pelo programa vmd.

Fonte: Do autor.

Para interromper as interações intramoleculares que formam e mantêm as estruturas terciária e quaternária de uma proteína são necessárias de 1 a 7 kcal/mol. Valores de entropia entre a proteína e o ligante superiores à entropia das interações intramoleculares mostram que o complexo proteína ligante pode interagir de forma consistente, e ainda, as estruturas terciária e quaternária da proteína podem ser modificadas devido a essa interação (NELSON; COX, 2011). As energias de interação em sítios alternativos se mostraram melhores principalmente para o dímero, como mostrado na Tabela 4. As interações na interface entre os dois monômeros sugerem que a 7-epiclusianona possa exercer seu efeito de inibição ao se alojar no espaço entre os dois monômeros, desestabilizando um pouco o dímero e prejudicando sua ação enzimática. As duas melhores interações nessa interface foram as encontradas nas caixas 3 (Figuras 18 e 19) e 6 (Figuras 20 e 21). Esta redução na função da enzima por modificação da estrutura terciária do dímero é bem retratada no estudo de Deng et al. (1993), o qual retrata a importância desta interface entre os monômeros para a atividade do dímero.

Tabela 4 – Energias de interação obtidas pelo programa AutoDock4 entre a proteína SOD e a molécula 7-epiclusianona em diferentes sítios de ligação para a proteína na forma dimérica.

Caixa	Centro da caixa (x, y, z, em Å)	Energia (kcal/mol)
1	28.17, 7.965, -6.09	-7.00
2	11.67, -2.035, 6.91	-8.04
3	9.17, -4.035, 6.91	-8.42
4	10.17, 5.465, 6.91	-7.50
5	23.67, 10.965, 14.91	-7.38
6	26.67, -6.035, 7.91	-8.63
7	24.17, 13.465, -9.59	-8.62

Fonte: Do autor

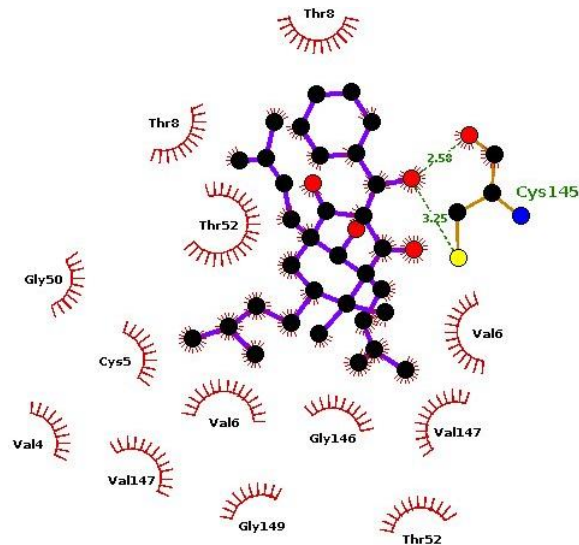


Figura 18 - Representação gráfica da interação entre a 7-epiclusianona e a SOD dimérica na caixa 3, calculada por experimento de docking. Gráfico plotado pelo programa ligplot. Os arcos vermelhos representam interações hidrofóbicas e os tracejados verdes pontes de hidrogênio.
Fonte: Do autor.

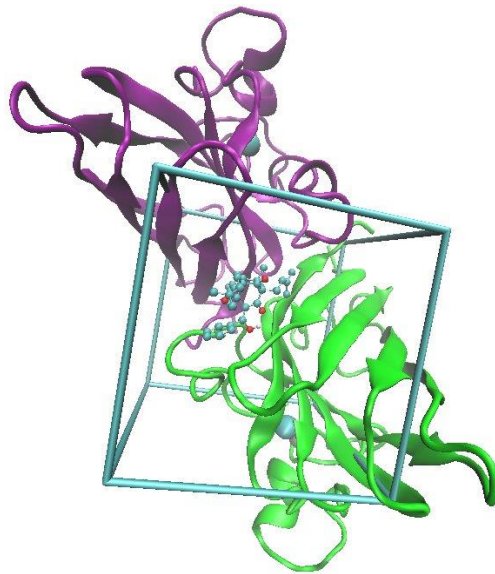


Figura 19- Conformação de interação entre a 7-epiclusianona(ciano) e a SOD monomérica(cadeia A em verde e B em rosa) na caixa 3, calculado por experimento de docking. Imagem renderizada pelo programa vmd.
Fonte: Do autor.

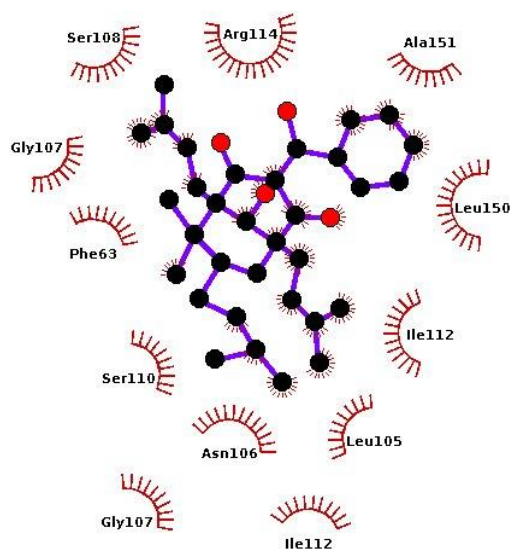


Figura 20 - Representação gráfica da interação entre a 7-epiclusianona e a SOD dimérica na caixa 6, calculada por experimento de docking. Gráfico plotado pelo programa ligplot. Os arcos vermelhos representam interações hidrofóbicas e os tracejados verdes pontes de hidrogênio.

Fonte: Do autor.

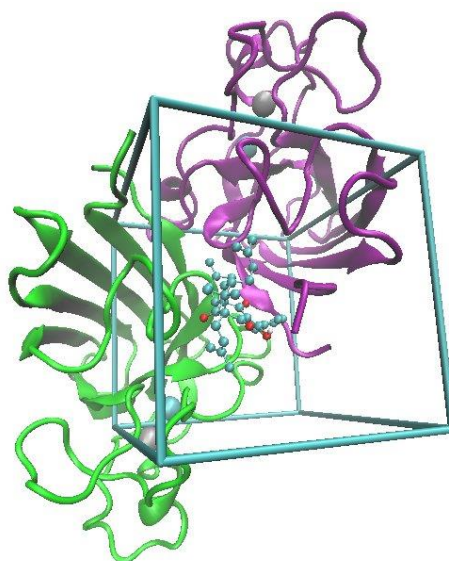


Figura 21 - Conformação de interação entre a 7-epiclusianona(ciano) e a SOD monomérica(cadeia A em verde e B em rosa) na caixa 6, calculado por experimento de docking. Imagem renderizada pelo programa vmd.

Fonte: Do autor.

A Tabela 5 apresenta as energias de docking encontradas para os sítios de ligação alternativos para a proteína na forma monomérica, onde a coluna “caixa” refere-se aos espaços de procura.

Tabela 5 – Energias de interação obtidas pelo programa AutoDock4 entre a proteína SOD e a molécula 7-epiclusianona em diferentes sítios de ligação para a proteína na forma monomérica.

Caixa	Centro da caixa (x, y, z, em Å)	Energia (kcal/mol)
1	35.007, 6.062, 3.082	-5.15
2	30.507, 24.062, -1.418	-4.53
3	18.507, 21.062, 6.582	-3.29
4	24.507, 13.562, -8.918	-8.40
5	27.007, 14.062, -7.418	-5.96
6	10.007, 7.062, 8.082	-5.70
7	19.507, 14.562, 8.582	-3.39
8	25.007, -3.938, -1.918	-3.25
9	3.507, 4.562, -6.918	-4.37

Fonte: Do autor

Outro resultado promissor foi o da caixa 4 (Figuras 22 e 23) da forma monomérica, o qual apresentou uma forte energia de interação em uma cavidade que se localiza no segmento posterior ao sítio ativo. A interação não ocorre diretamente nos resíduos do sítio catalítico, mas sim nos resíduos adjacentes, como a Leu 125, causando talvez um rearranjo na cavidade sítio ativo devido à adjacência destes aminoácidos ao sítio.

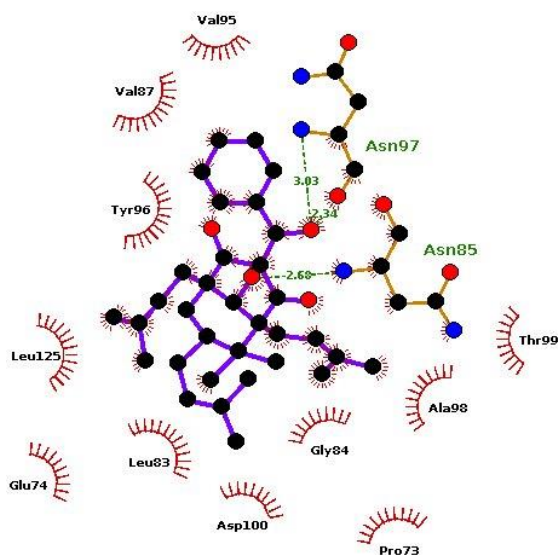


Figura 22 - Representação gráfica da interação entre a 7-epiclusianona e a SOD monomérica na caixa 4, calculada por experimento de docking. Gráfico plotado pelo programa ligplot. Os arcos vermelhos representam interações hidrofóbicas e os tracejados verdes pontes de hidrogênio.

Fonte: Do autor.

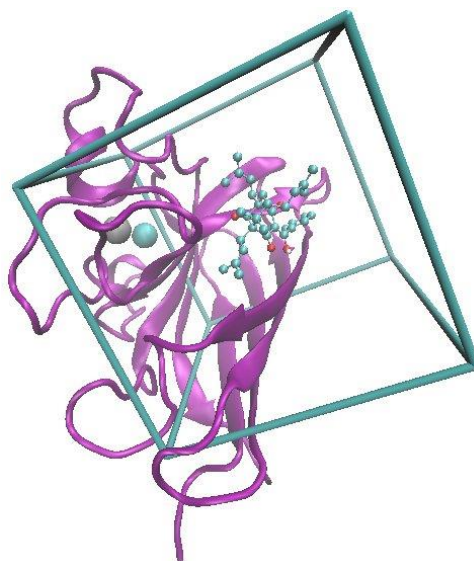


Figura 23 - Conformação de interação entre a 7-epiclusianona(ciano) e a SOD monomérica(rosa) na caixa 4, calculado por experimento de docking. Imagem renderizada pelo programa vmd.

Fonte: Do autor.

Outra forma de se ter a atividade da enzima atenuada pode ocorrer quando se observa um déficit na produção da mesma. Para verificar se o parasito sofre alguma alteração na produção da SOD, foi feita a avaliação no contexto molecular, quantificando o RNAm que codificaria a proteína desejada através da reação em cadeia da polimerase adaptada com a transcriptase reversa (RT-PCR) (LI et al., 2010; YANG et al., 2013).

Existem vários modelos de sinalização de amplificação para a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), que se baseiam no uso de sondas lineares (*Dual Labeled Fluorescent Probes*), podendo estas serem de hibridização ou hidrólise, e técnicas baseadas na detecção por corantes que se ligam ao DNA, como SYBR Green[®], Brometo de Etídeo e Hoechst 33258 (BUSTIN, 2002; DRAGAN et al., 2012; “qPCR Technical Guide”, 2008).

O modelo químico escolhido para este trabalho foi o SYBR Green I[®] (Figura 24). Este corante consegue aumentar a sua emissão luminosa drasticamente (>1.000 vezes) quando interage com uma molécula de DNA dupla-fita (dsDNA) e apresenta vantagens como baixo custo, utiliza os mesmos primers do PCR convencional, consegue fornecer *melt curves*, permitindo avaliar a especificidade do amplicon e possibilitando o uso de um modelo multiplex, com adição de um padrão interno comparativo, permitindo a quantificação de expressão do alvo (AGRIMONTI et al., 2015; BALBONI et al., 2015; DRAGAN et al., 2012; “qPCR Technical Guide”, 2008).

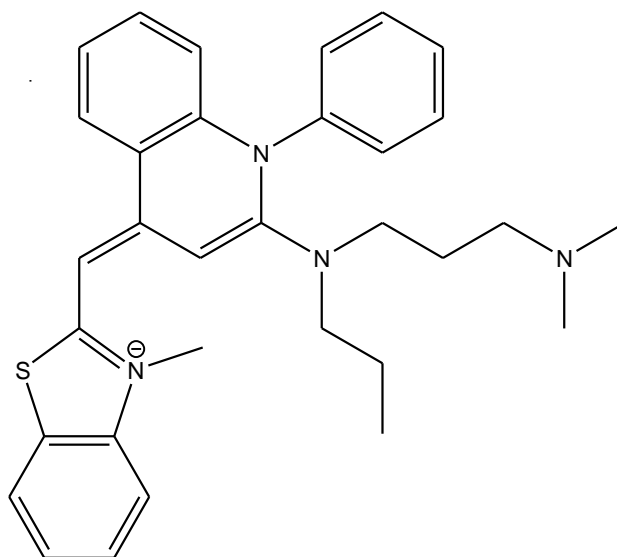


Figura 24 - Estrutura SYBR Green I®.
Fonte: Do autor.

Neste sentido, foi possível quantificar a expressão da superóxido dismutase após ação de diferentes dosagens de um determinado composto, para averiguar se o contato com a droga tem impacto na produção da enzima, de uma forma semelhante à aplicada no trabalho de Li et al. (2010). Para normalização dos resultados obtidos na análise de expressão, há necessidade de quantificação paralela de um fragmento referente ao gene constitutivo da Actina, por exemplo, a qual não sofreria alterações com os tratamentos (BUSTIN, 2000).

Os grupos preparados foram de cinco concentrações da 7-epiclusianona (100, 50, 25, 12,5 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$) e três controles: PZQ, Kolliphor® EL e RPMI. O limiar dos ciclos (*Cycle Threshold* – Ct) é o dado mais importante na expressão gênica quantitativa, utilizado para determinar a alíquota de DNA presente em cada amostra por ser relacionado ao número inicial de cópias. Para avaliação da expressão da SOD por qPCR foi utilizado a ACT como gene constitutivo de referência. Não foi possível observar diferenças entre diferentes tratamentos e em relação aos controles (Figuras 25 e 26). Talvez os desvios padrão não estejam permitindo a distinção entre os grupos, mostrando que o teste necessita ser ampliado em número de amostras. Mas preliminarmente não se observa diferenças significativas em relação inibição da expressão de RNAm com os tratamentos da 7-epi.

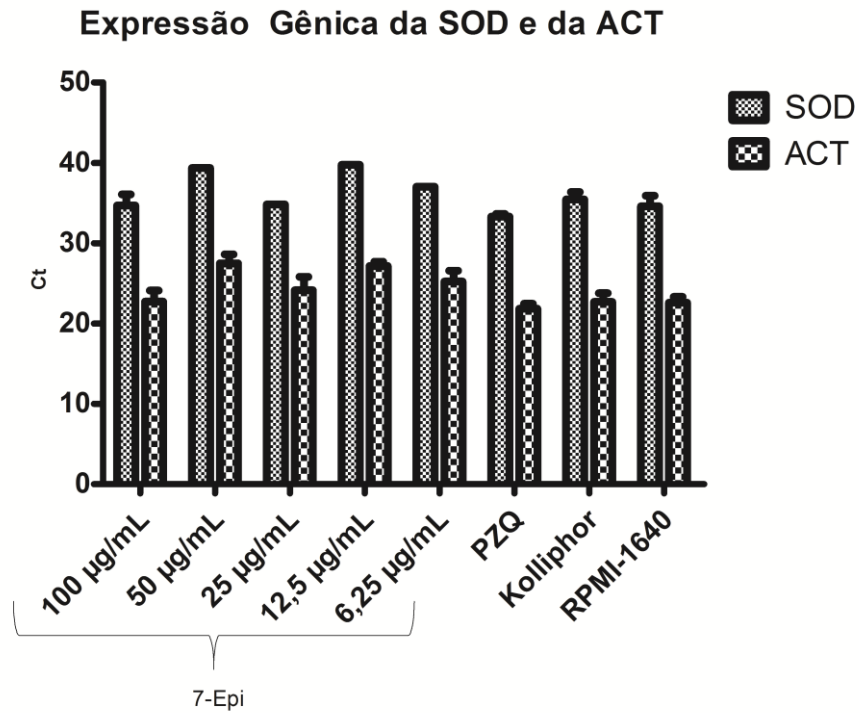


Figura 25 - Avaliação da expressão da SOD por qPCR e utilizando a ACT como gene constitutivo de referência. Os parasitos tratados in vitro e o eixo Y representa o Ct de cada amostra.

Fonte: Do autor.

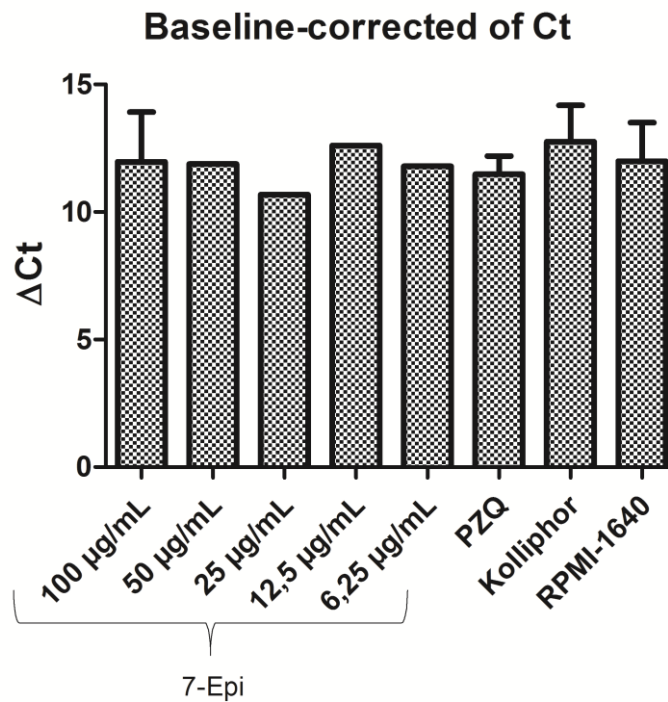


Figura 26 - Expressão relativa da SOD comparando os ΔCt tendo como base a expressão do grupo saudável RPMI.

Fonte: Do autor.

7 CONCLUSÃO

- a) O ED₅₀ da 7-epiclusianona ficou próximo ao obtido no trabalho de Castro et al. (2015a) mostrando reprodutibilidade da ação do composto sobre os vermes adultos do *Schistosoma mansoni*.
- b) A 7-epiclusianona começou a reduzir o efeito da superóxido dismutase em uma concentração aproximadamente duas vezes maior que a concentração que matou 50% dos parasitos e na qual os danos no tegumento começam a se intensificar.
- c) A 7-epiclusianona começou a reduzir o efeito da superóxido dismutase na concentração de 12,5 µg/mL, reduzindo sua atividade em aproximadamente 30% quando comparada ao controle, estando próxima ao ED₉₀ e é a concentração na qual os danos no tegumento se apresentaram intensos.
- d) O ED₅₀ do composto sendo inferior a esta concentração mostra que o tratamento ainda apresenta certa letalidade em concentrações onde a SOD não apresenta queda expressiva de atividade, sugerindo este efeito como coadjuvante.
- e) A quantificação do Malondialdeído reforça esta conclusão mostrando que nas concentrações de uso a presença do composto não foi capaz de atenuar a presença de espécies reativas, apontando que a inibição singular da enzima não é capaz de induzir estresse oxidativo danoso no trematódeo.
- f) O *docking* molecular constatou a incompatibilidade da 7-epiclusianona com o sítio ativo da enzima e a presença de cavidades nas quais o composto apresentou forte interação, tanto adjacente ao sítio ativo quanto na interface dos monômeros, reforçando a teoria do sítio alostérico.
- g) O trematódeo não apresentou variação na expressão de RNAm codificador da SOD após o tratamento, mostrando que a benzofenona não exerce influência sobre a produção desta enzima.

Este trabalho abre questionamento para a busca de mecanismos sinérgicos, como, por exemplo, outras enzimas utilizadas na detoxificação de EROs e tem sua relevância à medida que orienta estudos futuros com a 7-epiclusianona.

REFERÊNCIAS

- ABATH, F. G.; WERKHAUSER, R. C. The tegument of *Schistosoma mansoni*: functional and immunological features. *Parasite immunology*, v. 18, n. 1, p. 15–20, 1996.
- ABDEL-HAFEEZ, E. H. et al. Therapeutic effect of alpha lipoic acid combined with praziquantel on liver fibrosis induced by *Schistosoma mansoni* challenged mice. *Parasitology research*, v. 111, n. 2, p. 577–86, ago. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22398831>>. Acesso em: 22 jul. 2014.
- AGRIMONTI, C. et al. A quadruplex PCR (qxPCR) assay for adulteration in dairy products. *Food Chemistry*, v. 187, p. 58–64, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615005622>>. Acesso em: 25 jul. 2015.
- ALMEIDA, L. S. B. et al. Antimicrobial activity of *Rheedia brasiliensis* and 7-epiclusianone against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine*, v. 15, n. 10, p. 886–91, out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18276126>>. Acesso em: 3 mai. 2014.
- ALVES, T. M. et al. Biological activities of 7-epiclusianone. *Journal of natural products*, v. 62, n. 2, p. 369–71, fev. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10075791>>. Acesso em: 13 mar. 2014.
- ANDERSON, D.; PHILLIPS, B. J. Comparative in vitro and in vivo effects of antioxidants. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association*, v. 37, n. 9-10, p. 1015–25, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10541459>>. Acesso em: 13 mar. 2014.
- ANDRADE, Z. A.; SILVA, L. M.; DE SOUZA, M. M. An experimental approach to the pathogenesis of “pipestem” fibrosis (Symmers’ fibrosis of the liver). *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, n. 5, p. 699–706, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9566242>>. Acesso em: 15 ago. 2015.
- ARAGON, A. D. et al. Towards an understanding of the mechanism of action of praziquantel. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 164, n. 1, p. 57–65, 2009.
- BALBONI, A. et al. Development of a SYBR Green real-time PCR assay with melting curve analysis for simultaneous detection and differentiation of canine adenovirus type 1 and type 2. *Journal of Virological Methods*, v. 222, p. 34–40, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0166093415001986>>. Acesso em: 25 jul. 2015.

BARROS, G. V. et al. Evaluation of the Schistosomicidal Potential of Guttiferone-A obtained from *Garcinia brasiliensis*'s Seed. *Biological and Chemical Research*, p. 50–63, 2015.

Disponível em: <<http://www.ss-pub.org/journals/biological-and-chemical-research/issues/vol-2-issue-1-january-2015/vol2issue1n5/>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

BARSOUM, R.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. *Journal of advanced research*, v. 4, n. 5, p. 433–444, set. 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2013.01.005>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

BARSOUM, R. S.; ESMAT, G.; EL-BAZ, T. Human Schistosomiasis: Clinical Perspective: Review. *Journal of Advanced Research*, v. 4, n. 5, p. 433–444, set. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123213000064>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

BERMAN, H.; HENRICK, K.; NAKAMURA, H. Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nature Structural Biology*, v. 10, n. 12, p. 980–980, dez. 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/nsb1203-980>>. Acesso em: 08 jan. 2016.

BLOOM, S.; KEMP, W.; LUBEL, J. Portal hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management. *Internal Medicine Journal*, v. 45, n. 1, p. 16–26, 2015.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, p. 248–54, 7 mai. 1976. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/942051>>. Acesso em: 9 jul. 2014.

BRASCHI, S.; BORGES, W. C.; WILSON, R. A. Proteomic analysis of the schistosome tegument and its surface membranes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 101 Suppl , p. 205–212, 2006.

BRASIL. Sigma-Aldrich. *SOD Assay Kit*. 2014 Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Datasheet/6/19160dat.pdf>>. Acesso em: 21 mai. 2014.

BUSTIN, S. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 29, n. 1, p. 23–39, 1 ago. 2002. Disponível em: <<http://jme.endocrinology-journals.org/cgi/doi/10.1677/jme.0.0290023>>. Acesso em: 28 jul. 2015.

BUSTIN, S. A. Absolute quantification of mrna using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *Journal of Molecular Endocrinology*, v. 25, n. 2, p. 169–193, 2000.

CALLAHAN, H. L.; CROUCH, R. K.; JAMES, E. R. Helminth anti-oxidant enzymes: a protective mechanism against host oxidants? *Parasitology today (Personal ed.)*, v. 4, n. 8, p. 218–25, ago. 1988. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15463102>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

CARDOSO, R. M. F. et al. Structure of the cytosolic Cu,Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 60, n. 9, p. 1569–1578, 2004.

CASTRO, A. et al. Potent Schistosomicidal Constituents from *Garcinia brasiliensis*. *Planta Medica*, v. 81, n. 09, p. 733–741, 23 abr. 2015. Disponível em: <<http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0035-1545927>>. Acesso em: 10 mar. 2014.

CHIAL, H. J.; THOMPSON, H. B.; SPLITTGERBER, A. G. A Spectral Study of the Charge Forms of Coomassie Blue G. *Analytical Biochemistry*, v. 209, n. 2, p. 258–266, mar. 1993. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S0003269783711176/1-s2.0-S0003269783711176-main.pdf?_tid=63f55e4c-1b4f-11e5-8dd2-00000aab0f02&acdnat=1435246529_17cba32834f6baca73cb96d1e3e9df7e>. Acesso em: 25 jun. 2015.

CHIN, Y.-W. et al. Drug discovery from natural sources. *The AAPS Journal*, v. 8, n. 2, p. E239–E253, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/index/10.1007/BF02854894>>. Acesso em: 22 jul. 2014.

CHITSULO, L. et al. The global status of schistosomiasis and its control. *Acta tropica*, v. 77, n. 1, p. 41–51, 23 out. 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10996119>>. Acesso em: 22 jul. 2014.

CIOCIOLA, A. A.; COHEN, L. B.; KULKARNI, P. How drugs are developed and approved by the FDA: current process and future directions. *The American journal of gastroenterology*, v. 109, n. 5, p. 620–3, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24796999>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever? *Molecular and biochemical parasitology*, v. 195, n. 1, p. 23–9, jun. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24955523>>. Acesso em: 12 dez. 2014.

CIOLI, D. et al. Will new antischistosomal drugs finally emerge? *Trends in Parasitology*, v. 24, n. 9, p. 379–382, 2008.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present and

future? *Pharmacology & therapeutics*, v. 68, n. 1, p. 35–85, 1995. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0163725895000267>>. Acesso em: 5 mai. 2014.

COLLEY, D. G.; SECOR, W. E. Immunology of human schistosomiasis. *Parasite Immunology*, v. 36, n. 8, p. 347–357, ago. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/pim.12087>>. Acesso em: 5 mai. 2014.

COMPTON, S. J.; JONES, C. G. Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Analytical biochemistry*, v. 151, n. 2, p. 369–374, 1985.

COURA, J.; AMARAL, R. Epidemiological and control aspects of schistosomiasis in Brazilian endemic areas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 5 Suppl 1, p. 13–19, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0074-02762004000900003&script=sci_arttext>. Acesso em: 5 mai. 2014.

COURA, J. R. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.02.008>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

CRUZ, A J. et al. Vascular effects of 7-epiclusianone, a prenylated benzophenone from *Rheedia gardneriana*, on the rat aorta. *Phytomedicine*, v. 13, n. 6, p. 442–5, jun. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16716915>>. Acesso em: 3 mai. 2014.

DA SILVA, A C. et al. Molecular cloning of a 16-kilodalton Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 52, n. 2, p. 275–278, 1992.

DAVEY, M. W. et al. High-throughput determination of malondialdehyde in plant tissues. *Analytical Biochemistry*, v. 347, n. 2, p. 201–207, 2005.

DE JESUS, A. R. et al. Clinical and immunologic evaluation of 31 patients with acute schistosomiasis mansoni. *The Journal of infectious diseases*, v. 185, n. 1, p. 98–105, 2002.

DENG, H. et al. Amyotrophic Lateral Sclerosis and Structural Defects in Cu, Zn Superoxide Dismutase. *Science*, v. 261, n. 5124, p. 1047–1051, 1993.

DIEFFENBACH, C. W.; LOWE, T. M.; DVEKSLER, G. S. General concepts for PCR

primer design. *PCR methods and applications*, v. 3, n. 3, p. S30–S37, 1993.

DOENHOFF, M. J. et al. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 96, n. 5, p. 465–9, jan. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12474468>>. Acesso em: 25 jan. 2016.

DRAGAN, A. I. et al. SYBR Green I: Fluorescence Properties and Interaction with DNA. *Journal of Fluorescence*, v. 22, n. 4, p. 1189–1199, 2012.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. In: WILSON, K. L.; SONNENBERG, A. (Org.). *Methods in Enzymology*. [S.l.]: Elsevier Inc., 1990. p. 421–431. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/007668799086135I>>. Acesso em: 19 set. 2015.

EL RIDI, R. A. F.; TALLIMA, H. A.-M. Novel Therapeutic and Prevention Approaches for Schistosomiasis: Review. *Journal of Advanced Research*, v. 4, n. 5, p. 467–478, set. 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2090123212000318>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

ELBAZ, T.; ESMAT, G. Hepatic and Intestinal Schistosomiasis: Review. *Journal of Advanced Research*, v. 4, n. 5, p. 445–452, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jare.2012.12.001>>. Acesso em: 17 mar. 2014.

ENGELS, D. et al. The global epidemiological situation of schistosomiasis and new approaches to control and research. *Acta tropica*, v. 82, n. 2, p. 139–46, mai. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12020886>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

ESTADOS UNIDOS. Sigma-Aldrich. *PCR/Amplification*. qPCR Technical Guide. 2008. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/pcr/quantitative-pcr/qPCR-technical-guide.html>>.

ESTADOS UNIDOS. U. S. Food and Drug Administration. *Step 2: Preclinical Research*. 2015. Disponível em: <<http://www.fda.gov/ForPatients/Approvals/Drugs/ucm405658.htm>>. Acesso em: 19 out. 2015.

FERREIRA, L. G.; OLIVA, G.; ANDRICOPULO, A. D. Target-based molecular modeling strategies for schistosomiasis drug discovery. *Future Medicinal Chemistry*, v. 7, n. 6, p. 753–764, abr. 2015. Disponível em: <<http://www.future-science.com/doi/10.4155/fmc.15.21>>. Acesso em: 20 out. 2015.

GABA, S. et al. Cheminformatics Models for Inhibitors of Schistosoma mansoni Thioredoxin Glutathione Reductase. *The Scientific World Journal*, v. 2014, p. 1–9, 2014. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/957107/>>. Acesso em: 17 mar. 2014.

GAO, X.-M. et al. Novel polyisoprenylated benzophenone derivatives from *Garcinia paucinervis*. *Tetrahedron Letters*, v. 51, n. 18, p. 2442–2446, mai. 2010. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040403910003722>>. Acesso em: 3 mai. 2014.

GARCIA, L. S. Blood Trematodes: Schistosomes. In: GARCIA, L. S. (Org.). . *Diagnostic Medical Parasitology*. Fifth ed. Santa Monica, California: American Society of Microbiology, 2007. p. 445–477. Disponível em: <<http://www.asmscience.org/content/book/10.1128/9781555816018>>. Acesso em: 3 mai. 2014.

GERAPACHER-LARA, R. et al. Ultrasonography of periportal fibrosis in schistosomiasis mansoni in Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 91, n. 3, p. 307–9, jan. 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9231204>>. Acesso em: 5 nov. 2015.

GERSPACHER-LARA, R. et al. Splenic palpation for the evaluation of morbidity due to schistosomiasis mansoni. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 93 Suppl 1, p. 245–8, 1998. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9921361>>. Acesso em: 28 jul. 2014. Acesso em: 17 mar. 2014.

GRYSEELS, B. et al. Human schistosomiasis. *Lancet*, v. 368, n. 9541, p. 1106–18, set. 2006.

GRYSEELS, B.; DE VLAS, S. J. Worm burdens in schistosome infections. *Parasitology Today*, v. 12, n. 3, p. 115–119, 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15275241>. Acesso em: 13 mar. 2014.

GUIMARÃES, R. J. P. S. et al. Use of indicator kriging to investigate schistosomiasis in minas gerais state, Brazil. *Journal of tropical medicine*, v. 2012, p. 837428, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3265113&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

HALLIWELL, B. B. Free radicals and metal ions in health and disease. *Proc Nutr Soc*, v. 46:, p. 13–26, 1987.

HAMS, E.; AVIELLO, G.; FALLON, P. G. The schistosoma granuloma: friend or foe?

Frontiers in immunology, v. 4, n. April, p. 89, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3625856&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 5 mai. 2014.

HARRIS, R.; OLSON, A. J.; GOODSSELL, D. S. Automated prediction of ligand-binding sites in proteins. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, v. 70, n. 4, p. 1506–1517, 2007. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/prot.21645>>. Acesso em: 09 jan. 2016.

HOFFMANN, K.; WYNN, T.; DUNNE, D. Cytokine-mediated host responses during schistosome infections; walking the fine line between immunological control and immunopathology. In: BAETS, K. DE; LITTLEWOOD, D. T. J. (Org.). *Advances in Parasitology*. Advances in Parasitology. [S.l.]: Elsevier, 2002. v. 52. p. 265–307. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0065308X02520145>>. Acesso em: 3 mai. 2014.

HONG, Z. et al. Identification and purification of a second form of Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Infection and Immunity*, v. 60, n. 9, p. 3641–3651, 1992.

HONG, Z. et al. *Schistosoma mansoni*: A Cu/Zn Superoxide Dismutase Is Glycosylated When Expressed in Mammalian Cells and Localizes to a Subtegumental Region in Adult Schistosomes. *Experimental Parasitology*, v. 76, n. 2, p. 101–114, mar. 1993. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001448948371012X>>. Acesso em: 17 mar. 2014.

HONG, Z.; KOSMAN, D.; THAKUR, A. Identification and purification of a second form of Cu/Zn superoxide dismutase from *Schistosoma mansoni*. *Infection and ...*, v. 60, n. 9, p. 3641–3651, 1992. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/60/9/3641.short>>. Acesso em: 5 ma. 2014.

HOULT, J. R.; PAYÁ, M. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. *General pharmacology*, v. 27, n. 4, p. 713–22, jun. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8853310>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

HUANG, H. The Redox Biology of Schistosome Parasites and Applications for Drug Development. *Current Pharmaceutical Design*, v. 18, n. 24, p. 3595–3611, 2012.

HUEY, R.; MORRIS, G. M.; FORLI, S. Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A Tutorial. p. 32, 2012.

JAMES, E. R. Superoxide dismutase. *Parasitology Today*, v. 10, n. 12, p. 481–484, jan. 1994. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0169475894901619>>. Acesso em: 17 mar. 2014.

KATZ, N.; COELHO, P. M. Z. Clinical therapy of schistosomiasis mansoni: The Brazilian contribution. *Acta Tropica*, v. 108, n. 2-3, p. 72–78, 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X08001411>>. Acesso em: 21 mar. 2014.

KATZ, N.; PEIXOTO, S. Análise crítica da estimativa do número de portadores de esquistossomose mansoni no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n. 3, p. 303–308, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rsbmt/v33n3/2478.pdf>>. Acesso em: 5 mai. 2014.

KATZ, N.; PELLEGRINO, J.; PEREIRA, J. Experimental chemotherapy of Schistosomiasis III: laboratory and clinical trials with trichlorphone, an organophosphorus compound. *Revista da Sociedade Brasileira de ...*, v. 2, n. 5, p. 237–245, 1968. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0037-86821968000500002&script=sci_arttext>. Acesso em: 8 mai. 2014.

KEMP, W.; VAUGHAN, R.; CHIN-DUSTING, J. P. F. The Hemodynamics of Portal Hypertension. In: HELMY, A. (Org.). *Portal Hypertension: Pathogenesis and Management*. [S.l.]: Nova Science Publishers, 2005. p. 551. Disponível em: <<https://books.google.com/books?id=OEYHeiBt-agC&pgis=1>>. Acesso em: 7 dez. 2015.

KIM, S. et al. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. D1, p. D1202–D1213, 4 jan. 2016. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/nar/gkv951>>. Acesso em: 09 jan. 2014.

KING, C. H.; DANGERFIELD-CHA, M. The unacknowledged impact of chronic schistosomiasis. *Chronic illness*, v. 4, n. 1, p. 65–79, 2008.

KOLÁŘOVÁ, L. et al. Cercarial dermatitis, a neglected allergic disease. *Clinical reviews in allergy & immunology*, v. 45, n. 1, p. 63–74, ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22915284>>. Acesso em: 3 mai. 2014.

KOZERA, B.; RAPACZ, M. Reference genes in real-time PCR. *Journal of Applied Genetics*, v. 54, n. 4, p. 391–406, nov. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13353-013-0173-x>>. Acesso em: 03 jul. 2015.

LAMBERTUCCI, J. R. et al. A esquistossomose mansoni em minas gerais. v. 20, n. Vii, p.

47–52, 1987.

LAMBERTUCCI, J. R. Acute schistosomiasis mansoni: revisited and reconsidered. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 105, n. 4, p. 422–35, jul. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20721485>>. Acesso em: 03 ago. 2015.

LEE, H. et al. Synthesis and evaluation of 6-hydroxy-7-methoxy-4-chromanone- and chroman-2-carboxamides as antioxidants. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 15, n. 11, p. 2745–8, 2 jun. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15911250>>. Acesso em: 24 jul. 2014.

LEOW, C. Y. et al. Structure-function analysis of apical membrane-associated molecules of the tegument of schistosome parasites of humans: prospects for identification of novel targets for parasite control. *British Journal of Pharmacology*, v. 172, n. 7, p. 1653–1663, 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/bph.12898>>. Acesso em: 11 jan. 2016.

LI, A. et al. Functional expression and characterization of a cytosolic copper / zinc-superoxide dismutase of *Spirometra erinacei*. p. 627–635, 2010.

LIU, S. et al. Genome-wide identification and characterization of a panel of house-keeping genes in *Schistosoma japonicum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 182, n. 1-2, p. 75–82, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.12.007>>. Acesso em: 11 jan. 2016.

LOVERDE, P. T.; CHEN, L. Schistosome female reproductive development. *Parasitology today (Personal ed.)*, v. 7, n. 11, p. 303–8, nov. 1991. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15463396>>. Acesso em: 3 mai. 2014.

MAGALHÃES, L. G. et al. In vitro efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*. *Parasitology research*, v. 110, n. 5, p. 1747–54, mai. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22006194>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

MAGALHÃES, L. G. et al. In vitro schistosomicidal effects of some phloroglucinol derivatives from *Dryopteris* species against *Schistosoma mansoni* adult worms. *Parasitology research*, v. 106, n. 2, p. 395–401, jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19898869>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

MAIZELS, R. M. et al. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature*, v. 365, n. 6449, p. 797–805, 1993.

- MAIZELS R. M., BUNDY D. A., SELKIRK M. E., SMITH D. F., A. R. M. Immunological modulation and evasion by helminth parasites in human populations. *Nature*, v. 365, p. 797–805, 1993.
- MANTAWY, M. M. et al. Antioxidant and schistosomicidal effect of *Allium sativum* and *Allium cepa* against *Schistosoma mansoni* different stages. *European review for medical and pharmacological sciences*, v. 16 Suppl 3, n. Suppl 3, p. 69–80, jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22957420>>. Acesso em: 28 jul. 2014.
- MANTAWY, M. M.; ALI, H. F.; RIZK, M. Z. Therapeutic Effects of *Allium sativum* and *Allium cepa* in *Schistosoma mansoni* experimental infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 53, n. 3, p. 155–163, jun. 2011. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652011000300007&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 27 jul. 2014.
- MARTINS, F. T. et al. Natural polyprenylated benzophenones inhibiting cysteine and serine proteases. *European journal of medicinal chemistry*, v. 44, n. 3, p. 1230–9, mar. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18995931>>. Acesso em: 12 mai. 2014.
- MCLAREN, D. J.; HOCKLEY, D. J. Blood flukes have a double outer membrane. *Nature*, v. 269, n. 5624, p. 147–149, 8 set. 1977. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/269147a0>>. Acesso em: 11 jul. 2015.
- MENG, X.-Y. et al. Molecular docking: a powerful approach for structure-based drug discovery. *Current computer-aided drug design*, v. 7, n. 2, p. 146–157, 2011.
- MKOJI, G.; SMITH, J.; PRICHARD, R. Antioxidant systems in *Schistosoma mansoni*: Correlation between susceptibility to oxidant killing and the levels of scavengers of hydrogen peroxide and. *International Journal for Parasitology*, v. 18, n. 5, p. 663–666, 1988. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0020751988901014>>. Acesso em: 12 mai. 2014.
- MOHAMED-ALI, Q. et al. Susceptibility to periportal (Symmers) fibrosis in human schistosoma mansoni infections: evidence that intensity and duration of infection, gender, and inherited factors are critical in disease progression. *The Journal of infectious diseases*, v. 180, n. 4, p. 1298–1306, 1999.
- MONACHE, G. D. et al. Minor Xanthenes from *Rheedia gardiverzana*. *Phytochemistry*, v. 23, n. 8, p. 1757–1759, 1984.
- MONACHE, G. D.; MONACHE, F. D.; BETTOLO, G. B. M. Chemical investigation of the

genus *Rheedia*. II. Prenylated xanthenes from *Rheedia gardneriana*. *Journal of natural products*, v. 46, n. 5, p. 655–659, 1983. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np50029a011>>. Acesso em: 5 mai. 2014.

MONTENEGRO, S. M. et al. Cytokine production in acute versus chronic human Schistosomiasis mansoni: the cross-regulatory role of interferon-gamma and interleukin-10 in the responses of peripheral blood mononuclear cells and splenocytes to parasite antigens. *The Journal of infectious diseases*, v. 179, n. 6, p. 1502–1514, 1999.

MORRIS, G. M. et al. AutoDock4 and AutoDockTools4: Automated docking with selective receptor flexibility. *Journal of Computational Chemistry*, v. 30, n. 16, p. 2785–2791, dez. 2009. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jcc.21256>>. Acesso em: 08 jan. 2016.

MUKESH, B.; RAKESH, K. Molecular Docking : a Review. v. 2, n. 6, p. 1746–1751, 2011.
NEGRÃO-CORRÊA, D. et al. Interaction of *Schistosoma mansoni* Sporocysts and Hemocytes of *Biomphalaria*. *Journal of Parasitology Research*, v. 2012, p. 1–6, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3395257&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11 set. 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. *Princípios de Bioquímica*. 5. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2011.

NEVES, J. S. et al. Antianaphylactic properties of 7-epiclusianone, a tetraprenylated benzophenone isolated from *Garcinia brasiliensis*. *Planta medica*, v. 73, n. 7, p. 644–9, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562491>>. Acesso em: 3 mai. 2014.

OLIVEIRA, A. B. et al. The Impact of Organic Farming on Quality of Tomatoes Is Associated to Increased Oxidative Stress during Fruit Development. *PLoS ONE*, v. 8, n. 2, p. e56354, 20 fev. 2013. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0056354>>. Acesso em: 13 jun. 2015.

PASSOS, A. D. C. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica. In: BRASIL. Ministério da saúde (Org.). *Controle da esquistossomose: diretrizes técnicas*. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 1998. p. 70. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/cd11_01controle_esquist_diretrizes_tecnicas_1998.pdf>. Acesso em: 4 fev. 2015.

PEARCE, E. J.; MACDONALD, A. S. The immunobiology of schistosomiasis. *Nature reviews. Immunology*, v. 2, n. 7, p. 499–511, jul. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12094224>>. Acesso em: 2 mai. 2014.

PELLEGRINO, J. et al. Experimental chemotherapy of schistosomiasis mansoni. *Zeitschrift for Parasitenkunde*, v. 52, n. 2, p. 151–168, 1977. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00389900>>. Acesso em: 8 mai. 2014.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. fruits. *Phytomedicine*, v. 17, n. 5, p. 339–45, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19762221>>. Acesso em: 3 mai. 2014.

PEREIRA, I. O. et al. Natural products from *Garcinia brasiliensis* as *Leishmania* protease inhibitors. *Journal of medicinal food*, v. 14, n. 6, p. 557–62, jun. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21554130>>. Acesso em: 5 mai. 2014.

PESKIN, A. V; WINTERBOURN, C. C. A microtiter plate assay for superoxide dismutase using a water-soluble tetrazolium salt (WST-1). *Clinica Chimica Acta*, v. 293, n. 1-2, p. 157–166, mar. 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009898199002466>>. Acesso em: 29 jan. 2015.

PICCINELLI, A. L. et al. Structural revision of clusianone and 7-epi-clusianone and anti-HIV activity of polyisoprenylated benzophenones. *Tetrahedron*, v. 61, n. 34, p. 8206–8211, ago. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0040402005010276>>. Acesso em: 3 mai. 2014.

PINHEIRO, C. S. et al. Computational Vaccinology: An Important Strategy to Discover New Potential *S. mansoni* Vaccine Candidates. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2011, p. 1–9, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2011/503068/>>. Acesso em: 08 jan. 2016.

POLJSAK, B. et al. Reproductive Benefit of Oxidative Damage: An Oxidative Stress “Malevolence”? *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2011, p. 1–9, 2011. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/omcl/2011/760978/>>. Acesso em: 25 mar. 2014.

POLJSAK, B.; MILISAV, I. Oxidized forms of dietary antioxidants: Friends or foes? *Trends in Food Science & Technology*, v. 39, n. 2, p. 156–166, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0924224414001630>>. Acesso em: 22 mar. 2014.

RAPADO, L. N. et al. Schistosomiasis control using pipartine against *Biomphalaria glabrata* at different developmental stages. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 6, p. e2251, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3675008&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 28 jul. 2014.

REY, L. *Schistosoma mansoni* e Esquistossomíase: A Doença. *Parasitologia: Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nas Américas e na África*. Guanabara ed. Rio de Janeiro: [s.n.], 2001. p. 426–43.

SANTA-CECÍLIA, F. V et al. 7-Epiclusianone, the Natural Prenylated Benzophenone, Inhibits Superoxide Anions in the Neutrophil Respiratory Burst. *Journal of medicinal food*, v. 15, n. 2, p. 200–5, fev. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22191630>>. Acesso em: 3 mai. 2014.

SANTOS, A. B. A.; SOUZA, M. M. DE; ZILTON, A. A. Reinfecções e desenvolvimento da fibrose periportal esquistossomótica no modelo murino. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 33, n. 2, p. 197–200, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822000000200007>. Acesso em: 21 mar. 2014.

SANTOS, M. H. DOS et al. 7-Epiclusianona, a nova benzofenona tetraprenilada e outros constituintes químicos dos frutos de *Rheedia gardneriana*. *Química Nova*, v. 22, n. 5, p. 654–660, set. 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40421999000500005&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 3 mai. 2014.

SARVEL, A. K. *et al.* Evaluation of a 25-year-program for the control of schistosomiasis mansoni in an endemic area in Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 3, 2011.

SAYED, A.; COOK, S.; WILLIAMS, D. Redox balance mechanisms in *Schistosoma mansoni* rely on peroxiredoxins and albumin and implicate peroxiredoxins as novel drug targets. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 25, p. 17001–17010, 23 jun. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16606626>>. Acesso em: 5 mai. 2014.

SHALABY, K. A. et al. Protection against *Schistosoma mansoni* utilizing DNA vaccination with genes encoding Cu/Zn cytosolic superoxide dismutase, signal peptide-containing superoxide dismutase and glutathione peroxidase enzymes. *Vaccine*, v. 22, n. 1, p. 130–136, 2003.

SHER, A.; MOSER, G. Schistosomiasis: immunologic properties of developing schistosomula. *The American journal of pathology*, v. 102, n. 1, p. 121–126, 1981.

SILVA, L. M. et al. Characterization of the vascular changes in schistosomal portal (pipestem) fibrosis of mice. *Acta tropica*, v. 98, n. 1, p. 34–42, 2006.

SIMURDA, M. C. et al. *Schistosoma mansoni*: identification and analysis of an mRNA and a

gene encoding superoxide dismutase (Cu/Zn). *Experimental parasitology*, v. 67, n. 1, p. 73–84, 1988.

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

STEINMANN, P. et al. Schistosomiasis and water resources development: systematic review, meta-analysis, and estimates of people at risk. *The Lancet infectious diseases*, v. 6, n. 7, p. 411–25, jul. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16790382>>. Acesso em: 7 mai. 2014.

STOKES, A. H. et al. Effects of Solutol (Kolliphor) and cremophor in polyethylene glycol 400 vehicle formulations in Sprague-Dawley rats and Beagle dogs. *International journal of toxicology*, v. 32, n. 3, p. 189–97, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23616145>>. Acesso em: 24 mar. 2014.

TADROS, T.; TRABER, D. L.; HERNDON, D. N. Hepatic blood flow and oxygen consumption after burn and sepsis. *The Journal of trauma*, v. 49, n. 1, p. 101–8, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10912865>>. Acesso em: 17 abr. 2014.

THORNTON, B.; BASU, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v. 39, n. 2, p. 145–154, 2011.

VAN DER WERF, M. J. et al. Quantification of clinical morbidity associated with schistosome infection in sub-Saharan Africa. *Acta Tropica*, v. 86, n. 2-3, p. 125–139, mai. 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0001706X03000299>>. Acesso em: 28 abr. 2014.

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

VAN-LUME, D. S. et al. Association between Schistosomiasis mansoni and hepatitis C: systematic review. *Rev Saude Publica*, v. 47, n. 2, p. 414–424, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). *Schistosomiasis: Fact Sheet*. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>>. Acesso em: 14 jan. 2015.

WINK, M. Medicinal plants: a source of anti-parasitic secondary metabolites. *Molecules*

(Basel, Switzerland), v. 17, n. 11, p. 12771–91, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23114614>>. Acesso em: 23 jul. 2014.

WROBEL, G.; KOKOCINSKI, F.; LICHTER, P. AutoPrime: selecting primers for expressed sequences. *Genome Biol*, v. 5, n. P11, p. 1–7, 2004.

WU, S.-B.; LONG, C.; KENNELLY, E. J. Structural diversity and bioactivities of natural benzophenones. *Natural product reports*, v. 31, n. 9, p. 1158–74, set. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24972079>>. Acesso em: 4 nov. 2014.

YANG, J. et al. Characterization and expression of cytoplasmic copper/zinc superoxide dismutase (CuZn SOD) gene under temperature and hydrogen peroxide (H₂O₂) in rotifer *Brachionus calyciflorus*. *Gene*, v. 518, n. 2, p. 388–396, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2012.12.101>>. Acesso em: 31 jun. 2015.

YE, J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, v. 13, n. 1, p. 134, 2012.

YE, Z.-W. et al. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 1850, n. 8, p. 1607–1621, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304416514003870>>. Acesso em: 3 mai. 2014.

YOUSIF, F. et al. Large-scale in Vitro . Screening of Egyptian Native and Cultivated Plants for Schistosomicidal Activity. *Pharmaceutical Biology*, v. 45, n. 6, p. 501–510, 2007. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/13880200701389425>>. Acesso em: 13 mar. 2014.

YURYEV, A. *PCR Primer Design*. New York, NY: Springer New York, 2015. v. 1275. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2365-6>>. (Methods in Molecular Biology). Acesso em: 3 jul. 2015.

ZOR, T.; SELINGER, Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: theoretical and experimental studies. *Analytical biochemistry*, v. 236, n. 2, p. 302–308, 1996.