

RESUMO

A esquistossomose, uma doença parasitária causada pelo verme do gênero *Schistosoma*, impacta mais de 250 milhões de indivíduos, principalmente em áreas em desenvolvimento. Apesar de suas sérias implicações na saúde pública e economia, apenas um fármaco, o praziquantel, está atualmente disponível para seu tratamento. Consequentemente, há uma urgente necessidade de identificar novos agentes anti-helmínticos. Este estudo se baseia em nossa extensa pesquisa de compostos bioativos a partir da diversidade botânica. Nossa investigação concentra-se nas neolignanas *threo*-austrobailignan-6 e verrucosin, isoladas da planta *Saururus cernuus* L. (Saururaceae), e avalia sua eficácia contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Ambas as neolignanas demonstraram uma notável atividade esquistossomicida, com valores de EC₅₀ variando de 12,6 a 28,1 µM. Exames posteriores revelaram uma redução na produção de ovos por *S. mansoni* quando expostos a *threo*-austrobailignan-6 e verrucosin. A análise por microscopia eletrônica de varredura evidenciou alterações morfológicas nos esquistossomos após a exposição a essas neolignanas. Além de suas propriedades contra *Schistosoma*, *threo*-austrobailignan-6 e verrucosin demonstraram baixa citotoxicidade em células humanas (HaCaT) e animais (Vero), indicando um alto nível de seletividade. Esses resultados sugerem promissoras propriedades químicas e biológicas dessas neolignanas, destacando seu potencial como candidatos para futuros tratamentos da esquistossomose.

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose, é uma enfermidade causada por parasitas do gênero *Schistosoma*, está diretamente relacionada à pobreza e à falta de saneamento adequado, constituindo um desafio global preocupante. Ela se destaca como uma das infecções por helmintos mais preocupantes, sendo endêmica em mais de 70 países. Segundo dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 200 milhões de pessoas estão infectadas, e 800 milhões estão em risco de contrair a doença¹. Esta parasitose é responsável por 280-500 mil mortes anualmente. No Brasil, a esquistossomose é endêmica em 19 estados, com milhões de pessoas estimadas como infectadas e sob risco².

Devido à ausência de uma vacina, a principal estratégia de controle da esquistossomose se concentra na prevenção da morbidade por meio de tratamento regular. Infelizmente, existe apenas um medicamento disponível para o controle da doença: o praziquantel³. Esse medicamento, administrado em dose única por via oral, é eficaz contra diversas espécies de trematódeos e cestóides, incluindo todas as espécies do gênero *Schistosoma* que afetam os seres humanos⁴. A estratégia da OMS para o controle da

esquistossomose envolve a realização de tratamentos em larga escala (quimioterapia preventiva) nas populações afetadas⁵.

Diante disso, as preocupações relacionadas ao desenvolvimento de tolerância ou resistência ao praziquantel evidenciam a necessidade premente de novas alternativas para o tratamento e a profilaxia da esquistossomose⁶. Taxas de cura insatisfatórias também têm sido relatadas⁷⁻⁸. No caso de infecções por *Schistosoma mansoni*, o praziquantel alcança uma taxa de cura de 75%⁹⁻¹⁰. A OMS destaca a urgência de novas intervenções terapêuticas para eliminar a esquistossomose humana até 2030¹¹.

A planta *Saururus cernuus* L. (Saururaceae) possui ampla distribuição nas Américas, incluindo o Brasil, e é encontrada em ambientes de água doce¹². Na medicina popular, essa planta é utilizada como anti-inflamatório e até mesmo como sedativo¹¹⁻¹². *S. cernuus* produz diversos compostos, incluindo alcaloides, terpenoides e lignanas¹³⁻¹⁴. Estudos têm demonstrado que as lignanas isoladas de *S. cernuus* apresentam efeitos antiprotozoários, incluindo *threo-threo*, *threo-erythro*-manassantin, bem como atividade contra as formas de amastigotas da *Leishmania mazonensis*¹⁵. Além disso, essas lignanas mostraram atividades contra as formas de amastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, com destaque para *threo*-austrobailignan-5, *threo*-austrobailignan-6 e *threo*-dihydroguaiaretic¹⁶.

Estudos prévios conduzidos por nosso grupo de pesquisa relataram o efeito anti-*Schistosoma* da piplartina de *Piper tuberculatum*¹⁷, da licarina A de *Nectandra oppositifolia*¹⁸, e do ácido 15 β -senecioiloxi-ent-caurênico de *Baccharis lateralis*¹⁹.

Com o propósito de descobrir novos agentes anti-esquistossomose a partir da biodiversidade brasileira, este estudo relata o isolamento das neolignanas *threo*-austrobailignan-6 e verrucosin (Figura 1) das folhas de *S. cernuus* e a subsequente avaliação *in vitro* de sua atividade anti-esquistossomose contra *S. mansoni*.

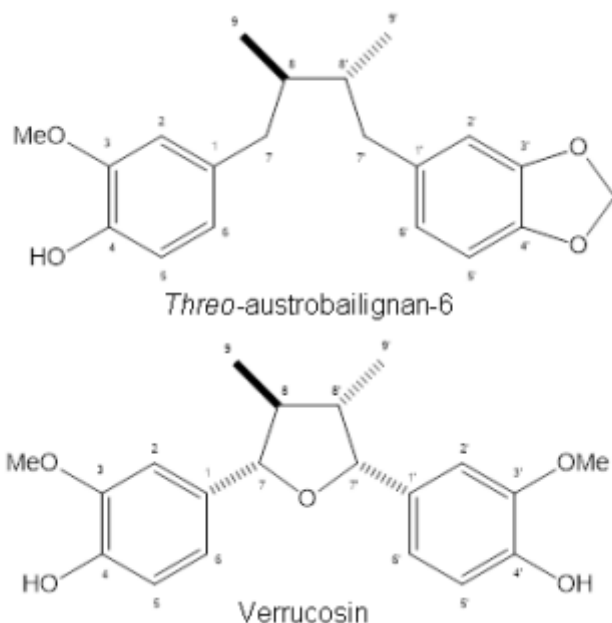


Figura 1. Estruturas químicas de neolignanas isolados de *S. cernuus*

ABSTRACT

Schistosomiasis, a parasitic disease caused by the *Schistosoma* worm, affects over 250 million individuals, primarily in developing countries. Despite its significant implications for public health and the economy, only one drug, praziquantel, is currently available for its treatment. Consequently, there is an urgent need to identify new anti-helminthic agents. This study builds upon our extensive research into bioactive compounds derived from botanical diversity. Our investigation focuses on the neolignans *threo*-austrobailignan-6 and verrucosin, isolated from the plant *Saururus cernuus* L. (Saururaceae), and evaluates their efficacy against adult *Schistosoma mansoni* worms. Both neolignans exhibited remarkable schistosomicidal activity, with EC₅₀ values ranging from 12.6 to 28.1 µM. Subsequent examinations revealed a substantial reduction in egg production by *S. mansoni* when exposed to *threo*-austrobailignan-6 and verrucosin. Scanning electron microscopy analysis demonstrated morphological alterations in the schistosomes following exposure to these neolignans. In addition to their anti-schistosomal properties, *threo*-austrobailignan-6 and verrucosin exhibited low cytotoxicity in human (HaCaT) and animal (Vero) cells, indicating a high level of selectivity. These findings suggest promising chemical and biological properties of these neolignans, highlighting their potential as candidates for future schistosomiasis treatments.

2. OBJETIVOS

Examinar o impacto antiparasitário das neolignanas *threo*-austrobailignan-6 e verrucosin, isoladas da planta *S. cernuus*, sobre vermes adultos de *S. mansoni*.

3. METODOLOGIA

3.1 Coleta do Material Vegetal

As folhas provenientes de *S. Cernuus* foram adquiridas de um produtor local de plantas ornamentais na cidade de Suzano, Estado de São Paulo, Brasil, no mês de agosto de 2019. Após a coleta, essas folhas receberam o código de registro A4123E4 no SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e Conhecimentos Tradicionais Associados, Ministério do Meio Ambiente, Brasil). A identificação botânica foi conduzida pela Dra. Fátima Otavina de Souza Buturi, da Universidade São Judas Tadeu, e pela Dra. Oriana Aparecida Fávero, da Universidade Presbiteriana Mackenzie. Um exemplar voucher (E. A. Ferreira – 001) foi depositado no Herbário SPF do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

3.2 Isolamento de Threo-austrobailignan-6 e Verrucosin

As folhas secas de *S. cernuus* (315 g) foram pulverizadas e submetidas a extrações exaustivas utilizando metanol (MeOH) à temperatura ambiente, resultando em 91 g de extrato bruto após a evaporação do solvente a pressão reduzida. Esse extrato foi posteriormente ressuspenso em uma solução de MeOH:H₂O na proporção 1:1 e submetido a uma partição com hexano, produzindo 18,6 g de fase hexano. Uma parte desse material (9,0 g) foi submetida a cromatografia em coluna, utilizando sílica gel como suporte, e eluída com n-hexano contendo quantidades crescentes de etilacetato (EtOAc), gerando quatorze frações (A–N). O Grupo C (671 mg) passou por uma nova etapa de cromatografia em coluna, também utilizando sílica gel e eluída com n-hexano contendo quantidades crescentes de EtOAc, resultando em seis frações (C1–C6). A fração C3 (232 mg) foi submetida a uma cromatografia em sílica gel eluída com n-hexano: EtOAc na proporção de 3:2, produzindo a fração C3-4 (25 mg) que foi posteriormente purificada por cromatografia em camada fina preparativa (TLC) utilizando tolueno e acetona na proporção de 7:3. Esse processo culminou na obtenção de threo-austrobailignan-6 (13 mg). Uma porção do Grupo G (760 mg) foi submetida a cromatografia em Sephadex LH-20, utilizando n-hexano: diclorometano (CH₂Cl₂) na proporção de 1:4 e CH₂Cl₂:acetona na proporção de 3:2, resultando na obtenção de verrucosin pura (335 mg).

3.3 Produtos e Reagentes Utilizados

Para conduzir os experimentos, foram empregados os seguintes produtos e reagentes, meio DMEM modificado, contendo 4 mM de L-glutamina, 4500 mg/L de glicose e 1 mM de piruvato de sódio, meio RPMI 1640, soluções de tripsina/EDTA, soro fetal bovino inativado por calor, soluções de penicilina G-estreptomicina (contendo 10.000 U/ml de sal sódico de penicilina G e 10 mg/ml de sulfato de estreptomicina), tampão HEPES, brometo de azul de tiazolil tetrazólio (MTT), DMSO (dimetilsulfóxido), praziquantel, gentilmente cedido pela Ecovet Indústria Veterinária Ltda (São Paulo, SP, Brasil). Em todos os ensaios *in vitro* realizados, os compostos foram dissolvidos em DMSO.

3.4 Parasitas, Hospedeiros e Linhagens Celulares

Neste estudo, utilizou-se a linhagem de *S. mansoni* BH (Belo Horizonte, MG), mantida no Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, Universidade Guarulhos (SP), sob a supervisão do Prof. Dr. Josué de Moraes. Os parasitos foram mantidos em caramujos *Biomphalaria glabrata* Say, 1818 (hospedeiros intermediários) e em camundongos Swiss (hospedeiros definitivos). Os camundongos, com três semanas de idade, foram adquiridos pela empresa Animais de Laboratório Criação e Comércio (Paulínea, SP, Brasil) e foram mantidos sob condições controladas (25 °C; umidade de 50%), com acesso livre a alimentos e água.

As cercárias de *S. mansoni* foram obtidas a partir de caramujos infectados em nosso laboratório. Além disso, foram utilizadas as linhagens celulares HaCaT (células

epiteliais humanas) e Vero (células de rim de macaco, ATCC CCL-81), as quais foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado por calor e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg /mL de estreptomicina) a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. As células foram posteriormente mantidas em frascos de cultura de 25 cm² (Corning, Tewksbury, MA, EUA) e colhidas utilizando uma solução de 0,25% de tripsina em solução de EDTA 0,2 g/L.

3.5 Ensaaios *In vitro*

Em resumo, os parasitos adultos do *S. mansoni*, que foram obtidos a partir de camundongos infectados no 42º dia após a infecção (conhecidos como parasitas *ex vivo*), foram colocados em placas de 24 poços de fundo plano da marca Corning (Nova York, NY, EUA). Isso foi feito em um ambiente contendo threo-austrobailignan-6 e verrucosin, começando com uma concentração inicial de 50 µM e seguindo com uma série de diluições com fator 3. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640, que foi complementado com 5% de soro fetal de vitela inativado e continha antibióticos (penicilina a 100U/mL e estreptomicina a 100 µg/mL).

Os esquistossomos de controle foram submetidos aos mesmos ensaios, mas em vez de threo-austrobailignan-6 e verrucosin, eles foram incubados em meio de cultura contendo 0,5% de DMSO, representando a maior concentração do solvente utilizado. Cada concentração foi testada em triplicata, e os experimentos foram repetidos em três ocasiões distintas. Os parasitos permaneceram nesse ambiente por 72 horas a uma temperatura de 37°C, com uma atmosfera contendo 5% de CO₂. Durante esse período, a viabilidade dos vermes foi acompanhada por meio de observações microscópicas. Além disso, para avaliar a capacidade reprodutiva do *S. mansoni*, o número de ovos produzidos foi contabilizado diariamente utilizando um microscópio invertido Motic AE2000 (Vancouver, Canadá).

3.6 Teste de Toxicidade em Células

De forma concisa, as células foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços, com uma densidade de 2×10^3 células por poço. Em seguida, elas foram incubadas com threo-austrobailignan-6 e verrucosin, começando com uma concentração inicial de 500 µM e, ao longo de 72 horas, foram submetidas a uma série de três diluições. Esse processo foi conduzido a uma temperatura de 37°C e com uma atmosfera contendo 5% de CO₂. Posteriormente, uma solução de MTT foi adicionada a cada poço, e a absorbância foi avaliada por meio de um Epoch Microplate Spectrofotometer (BioTek Instruments, Winooski, VT, EUA) a 595 nm. Para determinar os índices de seletividade (SI), a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) obtida nas células foi comparada com os valores de concentração efetiva de 50% (EC₅₀) determinados nos esquistossomos.

3.7 Análise Estatística

As análises estatísticas foram conduzidas utilizando o *software* Graph Pad Prism 8.0 (San Diego, CA, EUA). Os dados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão (DP) com base em pelo menos três experimentos independentes. Os valores de EC₅₀ e CC₅₀ foram calculados por meio de curvas de dose-resposta sigmóides. No que diz respeito à produção de ovos de *S. mansoni*, diferenças significativas foram determinadas por meio de análise de variância (ANOVA) de uma única via, com a aplicação do teste de Tukey para comparações múltiplas, estabelecendo um nível de significância em $P < 0,05$.

3.8 Aprovação Ética

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em total conformidade com a legislação brasileira referente às Diretrizes para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório. O protocolo de planejamento experimental foi minuciosamente revisado e aprovado pela Universidade Guarulhos (Guarulhos, SP, Brasil; protocolo ID 47/20).

4. Desenvolvimento

O *Schistosoma*, um trematódeo parasitário, é o agente causador da esquistossomose, uma doença de ampla relevância global. Em 2019, estimou-se que mais de 250 milhões de indivíduos precisaram de tratamento preventivo para essa enfermidade. Este tratamento preventivo deve ser repetido ao longo de vários anos, visando reduzir e prevenir a morbidade associada à doença. As formas larvais do parasito, liberadas pelos caramujos de água doce, têm a capacidade de infectar seres humanos ao penetrar na pele durante o contato com água contaminada¹.

A esquistossomose se desenvolve em três fases distintas: a infecção aguda, a infecção ativa estabelecida e a infecção crônica tardia. Ela pode evoluir para diferentes formas, incluindo a esquistossomose intestinal, onde os vermes residem nas veias mesentéricas, e a esquistossomose hepatoesplênica, onde uma proporção dos ovos é levada pelo fluxo sanguíneo para os portais do fígado, resultando em obstrução. Em casos graves, essa doença pode ser fatal². O tratamento com praziquantel atinge uma taxa de cura de aproximadamente 75% para a *S. mansoni*⁹⁻¹⁰.

A planta *Saururus cernuus*, encontrada em ambientes de água doce no Brasil¹², tem sido objeto de estudos que demonstram propriedades antiparasitárias de algumas de suas substâncias isoladas¹⁵. Neste estudo, as neolignanas *threo*-austrobailignan-6 e verrucosin foram isoladas com o objetivo de avaliar sua eficácia como agentes antiesquistossomóticos.

5. Resultados

Com base nos resultados alcançados, destacou-se que as neolignanas, em particular a verrucosin e o *threo*-austrobailignan-6, exibiram uma notável atividade

antiesquistossomática. Esses compostos demonstraram ser mais eficazes contra os esquistossomos em comparação com outros produtos derivados de plantas utilizados como referência. Os parasitos do grupo de controle permaneceram viáveis durante todo o período de observação, mas foi notável um início de ação rápido quando o *S. mansoni* foi exposto ao praziquantel, um medicamento de referência.

Os ensaios antiesquistossomóticos também revelaram que a verrucosin e o *threo*-austrobailignan-6 exibiram uma ligeira superioridade no que diz respeito à ação contra os vermes machos do *S. mansoni*. Por exemplo, a concentração de 25 μM de verrucosin resultou em uma mortalidade de 100% dos vermes machos após 48 horas de exposição, enquanto a mortalidade de todos os vermes fêmeas foi registrada somente após 72 horas. Além disso, quando pares de vermes adultos foram submetidos a *threo*-austrobailignan-6 na concentração de 25 μM , foi observada uma taxa de mortalidade de 100% apenas entre os vermes machos.

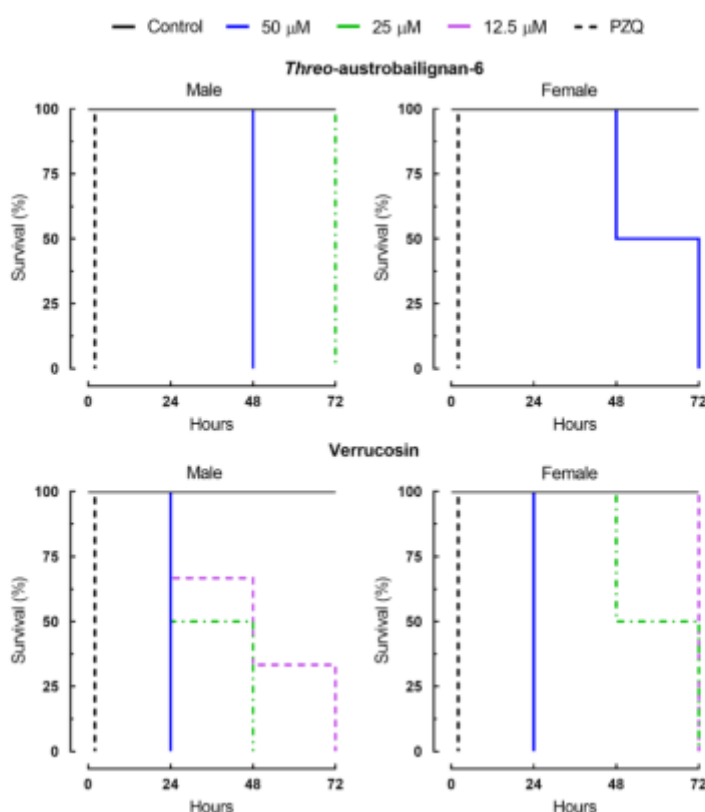


Figura 2. Viabilidade de vermes adultos de *S. mansoni* *ex vivo* após exposição a neolignanais.

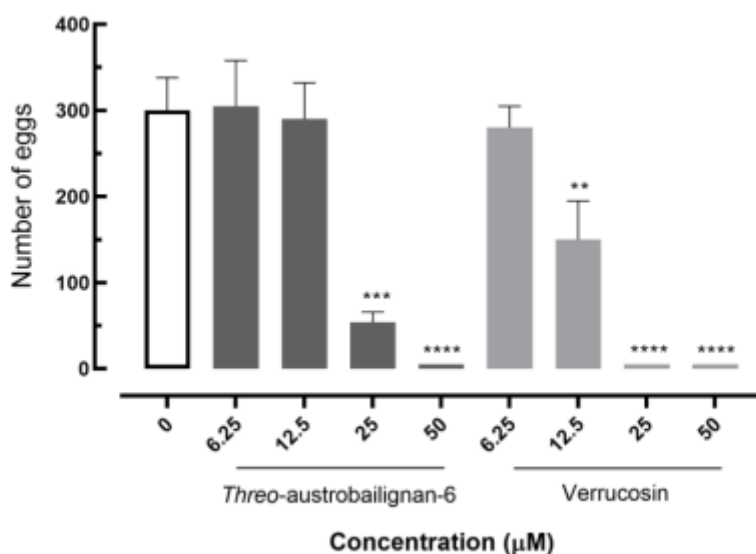


Figura 3. Ovos liberados por adultos *S. mansoni* expostos a neolignanas.

6. Conclusão

As neolignanas *threo*-austrobailignan-6 e verrucosin, que foram isoladas da planta aquática *S. cernuus*, demonstraram um notável potencial antiparasitário contra o verme *S. mansoni*, provocando danos graves em sua superfície externa e reduzindo significativamente a produção de ovos. Além disso, essas substâncias exibiram uma baixa toxicidade para células animais e humanas, resultando em índices de seletividade consideráveis. Dada a promissora natureza química e biológica da *threo*-austrobailignan-6 e verrucosin, essas lignanas podem servir como ponto de partida para o desenvolvimento de novos agentes contra *Schistosoma*.

7- Fontes consultadas

1. World Health Organization. Schistosomiasis (2022). <https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/schistosomiasis>
2. McManus, D.P., Dunne, D.W., Sacko, M., Utzinger, J., Vennervald, B.J. & Zhou, X.N. Schistosomiasis. Nat. Rev. Dis. Primers 4, 30093684. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0013-8> (2018).
3. Lago, E.M., Xavier, R.P., Teixeira, T.R., Silva, L.M., da Silva Filho, A.A. & de Moraes, J. antischistosomal agents: state of art and perspectives. Future Med. Chem. 10, 89–120. <https://doi.org/10.4155/fmc-2017-0112> (2018).

4. Mengarda, A.C., Iles, B., Longo, J.P.F. & de Moraes, J. Recent trends in praziquantel nanoformulations for helminthiasis treatment. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 14, 1–11. <https://doi.org/10.1080/17425247.2022.2051477> (2022).
5. Deol, A.K. et al. Schistosomiasis - assessing progress toward the 2020 and 2025 global goals. *N. Engl. J. Med.* 381, 2519–2528. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1812165> (2019).
6. Assaré, R.K. et al. Characteristics of persistent hotspots of *Schistosoma mansoni* in western Côte d'Ivoire. *Parasit. Vectors* 13, 337. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04188-x> (2020).
7. Greenberg R.M. New approaches for understanding mechanisms of drug resistance in schistosomes. *Parasitology* 140, 1534–1546. <https://doi.org/10.1017/S0031182013000231> (2013).
8. Kabuyaya, M., Chimbari, M.J. & Mukaratirwa, S. Efficacy of praziquantel treatment regimens in pre-school and school aged children infected with schistosomiasis in sub-Saharan Africa: A systematic review. *Infect. Dis. Poverty* 7, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s40249-018-0448-x> (2018).
9. Zwang, J. & Olliaro, P.L. Clinical efficacy and tolerability of praziquantel for intestinal and urinary schistosomiasis – a meta-analysis of comparative and noncomparative clinical trials. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8, e3286. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003286> (2014).
10. Zwang, J. & Olliaro, P. Efficacy and safety of praziquantel 40 mg/kg in preschool-aged and school-aged children: a meta-analysis. *Parasit. Vectors* 10, 47. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1958-7> (2017).
10. Zwang, J. & Olliaro, P. Efficacy and safety of praziquantel 40 mg/kg in preschoolaged and school-aged children: a meta-analysis. *Parasit. Vectors* 10, 47. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1958-7> (2017).
11. World Health Organization. Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030 (2021). <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>
12. Kubanek, J., Fenical, W., Hay, M.E., Brown, P.J. & Lindquist, N. Two antifeedant lignans from the freshwater macrophyte *Saururus cernuus*. *Phytochemistry* 54, 281–287. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00076-5](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00076-5) (2000).
13. Hodges, T.W., Hossain, C.F., Kim, Y.P., Zhou, Y.D. & Nagle, D.G.J. Molecular targeted antitumor agents: the *Saururus cernuus* dineolignans manassantin B and 4-O-demethylmanassantin B are potent inhibitors of hypoxia-activated HIF-1. *J. Nat. Prod.* 67, 767–771. <https://doi.org/10.1021/np030514m> (2004).
14. Brito, J.R. et al. Antileishmanial activity and ultrastructural changes of related tetrahydrofuran dineolignans isolated from *Saururus cernuus* L. (Saururaceae). *J. Pharm. Pharmacol.* 71, 1871–1878 (2019). <https://doi.org/10.1111/jphp.13171>
15. Brito, J.R. Costa-Silva, T.A., Tempone, A.G., Ferreira, E.A. & Lago, J.H.G. Dibenzylbutane neolignans from *Saururus cernuus* L. (Saururaceae) displayed anti-*Trypanosoma cruzi*

activity via alterations in the mitochondrial membrane potential. *Fitoterapia* 137, 104251 <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2019.104251> (2019).

16. Mengarda, A.C. et al. Antiparasitic activity of *piplartine* (piperlongumine) in a mouse model of schistosomiasis. *Acta Trop.* 205, 105350. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105350> (2020).

17. Sessa, D.P., Mengarda, A.C., Simplicio, P.E., Antar, G.M., Lago, J.H.G. & de Moraes, J. 15 β -Seneciyl-oxy-ent-kaur-16-en-19-oic acid, a diterpene isolated from *Baccharis lateralis*, as promising oral compound for the treatment of schistosomiasis. *J. Nat. Prod.* 83, 3744–3750, <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.0c01050> (2020).

18. Mengarda, A.C. et al. Licarin A, a neolignan isolated from *Nectandra oppositifolia* Nees & Mart. (Lauraceae), exhibited moderate preclinical efficacy against *Schistosoma mansoni* infection. *Phytother. Res.* 35, 5154–5162. <https://doi.org/10.1002/ptr.7184> (2021).