
Pesquisa Acadêmica

REPOSICIONAMENTO DA ESPIRONOLACTONA COMO DROGA ANTI-HELMÍNTICA: ESTUDOS *IN* *VITRO*

AUTORES

1. TAÍS CONCEIÇÃO DA SILVA

ESTUDANTE DO CURSO DE BIOMEDICINA

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE GUARULHOS

taisnith@hotmail.com

2. RAFAEL ARRUDA GUERRA

ESTUDANTE DE MESTRADO

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE GUARULHOS

rafaelarrudaguerra@gmail.com

3. MARCOS PAULO NASCIMENTO DA SILVA

ESTUDANTE DE DOUTORADO

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE GUARULHOS

marcos.npdn@gmail.com

4. JOSUÉ DE MORAES

ORIENTADOR

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE GUARULHOS

moraesnpdn@gmail.com

UNIVERSIDADE UNIVERSUS VERITAS GUARULHOS (UNIVERITAS
UNG)

RESUMO

As doenças causadas por helmintos representam um importante problema de Saúde Pública em diversos países. Estima-se que mais um bilhão de pessoas são acometidas por pelo menos uma helmintíase. Dentre elas, a esquistossomose é a mais importante em termos de morbidade e mortalidade, afetando mais de 200 milhões de pessoas em todo mundo, mormente nas regiões com falta de saneamento básico. Atualmente o tratamento da doença depende de apenas um fármaco, o praziquantel. Considerando que o financiamento de pesquisas para Doenças Negligenciadas é muito limitado e o desenvolvimento de um novo fármaco é um processo moroso, o reaproveitamento de fármacos é uma estratégia promissora. No presente estudo, ensaios biológicos *in vitro* mostraram que a espironolactona, um diurético poupador de potássio, tem atividade anti-helmíntica em *Schistosoma mansoni*, o agente etiológico da esquistossomose no continente americano. A espironolactona na concentração de 50 μ M reduziu a atividade motora, causou alterações morfológicas no tegumento dos esquistossomos adultos e 100% de mortalidade foi observada. Com base nos resultados, este fármaco pode ter aplicações terapêuticas para o tratamento e o controle das doenças causadas por helmintos.

PALAVRAS-CHAVE: espironolactona, *Schistosoma mansoni*, helmintos, anti-helmíntico.

INTRODUÇÃO

As helmintíases representam um grande problema de Saúde Pública, especialmente nas regiões pobres. Consideradas Doenças Negligenciadas, também conhecidas como Doenças da

Pobreza, os helmintos afetam mais de um bilhão de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais. Considerada a mais importante helmintíase, a esquistossomose é uma doença causada por parasitas pertencente ao gênero *Schistosoma* prevalente em países da África, África e América. Estudos epidemiológicos mostraram que a esquistossomose acomete aproximadamente 240 milhões de pessoas no mundo, sendo que mais de 700 milhões vivem em regiões endêmicas tendo maior incidência em países subdesenvolvidos com falta de saneamento básico e água potável (MUTAPI et al 2017). No Brasil é conhecida popularmente como barriga d'água por apresentar o acúmulo de líquidos na cavidade peritoneal causada em seu estágio mais avançado.

O tratamento dessa doença se limita a apenas um fármaco, o praziquantel que por sua vez contém algumas limitações como eficácia incompleta e farmacocinética fraca dificultando a eliminação da doença (VALE et al 2017). Existem estudos que relatam resistência/tolerância ao medicamento manifestando a grande necessidade de novos agentes esquistossomicidas. (LAGO et al 2018). Não obstante a importância da esquistossomose, o desenvolvimento de medicamentos pode levar décadas e o financiamento de pesquisas para medicamentos relacionados a pobreza é muito limitado. Nesse sentido, o reposicionamento de fármacos pode ser uma estratégia promissora que minimiza os custos e riscos associados ao desenvolvimento de medicamentos. (JIM e WONG, 2014). Os diuréticos são a classe de medicamento mais usada para o alívio da retenção líquida, são bem tolerados e seguros com possibilidade de administração oral. (SICA, 2017). Com base na triagem inicial foram avaliados 13 diuréticos dentre eles foi selecionada a espironolactona. Este fármaco é considerado um diurético poupador de potássio, antagonista farmacológico da aldosterona um hormônio da família dos mineralocorticoides, tem como alvo os rins e sua principal função é o balanço eletrolítico. No presente estudo avaliamos *in vitro* o efeito anti-helmíntico da espironolactona em vermes adulto de *S. mansoni*. Os resultados demonstraram o efeito na motilidade, a mortalidade e alterações morfológicas no tegumento do parasita. Portanto, este diurético pode ter aplicações terapêuticas como um anti-helmíntico promissor. Vale ressaltar que demais estudos são necessários como o efeito *in vivo* e o mecanismo de ação.

OBJETIVO

Avaliar o efeito *in vitro* da espironolactona em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

METODOLOGIA

Todos os ensaios biológicos foram realizados de acordo com os métodos descritos pelo nosso grupo (DE MORAES et al., 2014; DE BRITO et al., 2017). Sumariamente, na preparação para ensaios biológicos *in vitro* os vermes de ambos os sexos foram coletados por dissecação das veias intestinais de camundongos Swiss fêmeas pela técnica de perfusão, eutanasiados 7 semanas após a infecção. Os fármacos foram solubilizados em DMSO e diluídos em meio RPMI. Para o ensaio *in vitro*, um par de vermes foram transferidos para cada poço de uma placa de cultura de 24 poços contendo meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10% e antibióticos, posteriormente incubados a 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5%. Nas culturas de *S. mansoni* a espironolactona foi incubada na concentração inicial de 50 µM e posteriormente afim de obter a CL₅₀ nas concentrações de 25, 12,5, 6,25 e 3,12 µM. Os parasitas foram monitorados por até 72 horas e os efeitos foram avaliados utilizando um microscópio invertido ou lupa com ênfase nas mudanças morfológicas, taxa de mortalidade e ovoposição. Vermes incubados em DMSO (0,5%) serviram como controle negativo e 5 µM de praziquantel como controle positivo. A concentração letal dos compostos ativos foi calculada com o Software GraphPad Prism. O experimento foi realizado em triplicata.

As análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram realizadas no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (IF-USP), cujo protocolo de preparo de parasitas está descrito nos estudos prévios do nosso grupo (SILVA et al., 2017; GUIMARÃES et al., 2018).

RESULTADOS

A espironolactona exibiu atividade antiparasitária em uma série de três experimentos. Eles revelaram que a atividade anti-helmíntica da mesma é dependente da concentração. Após 48 horas de encubação a espironolactona, na concentração de 50 µM, ocasionou totalidade da

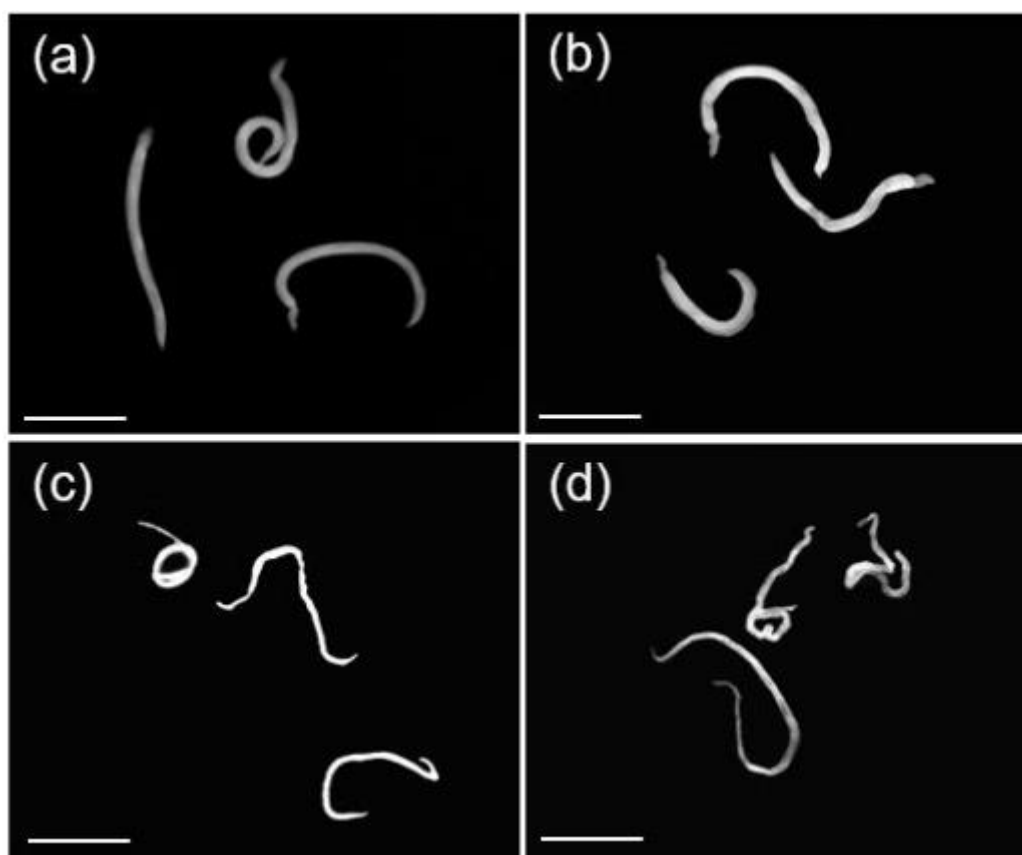
morte dos vermes machos, no entanto, em nenhuma das fêmeas. Enquanto que em 72 horas houve totalidade das mortes. Na concentração de 25 μM houve morte de 30% das fêmeas no período de 48 e 72 horas, nos machos, após 72 horas, houve morte de 60% dos parasitas. Na concentração de 12,5 μM houve morte de apenas 30% dos machos em 72h. Como observado na Tabela 1.

Tabela 1

Grupo	Período de incubação (h)	Morte dos vermes (%) ^a		Atividade motora reduzida (%) ^a			
		M	F	Leve		Significante	
				M	F	M	F
Controle	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
0.5% DMSO	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Praziquantel 2 μM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
Espironolactona 50 μM	24	0	0	30	30	0	0
	48	100	0	0	0	100	0
	72	100	100	0	0	100	100
Espironolactona 25 μM	24	0	0	60	30	0	0
	48	0	30	60	30	0	30

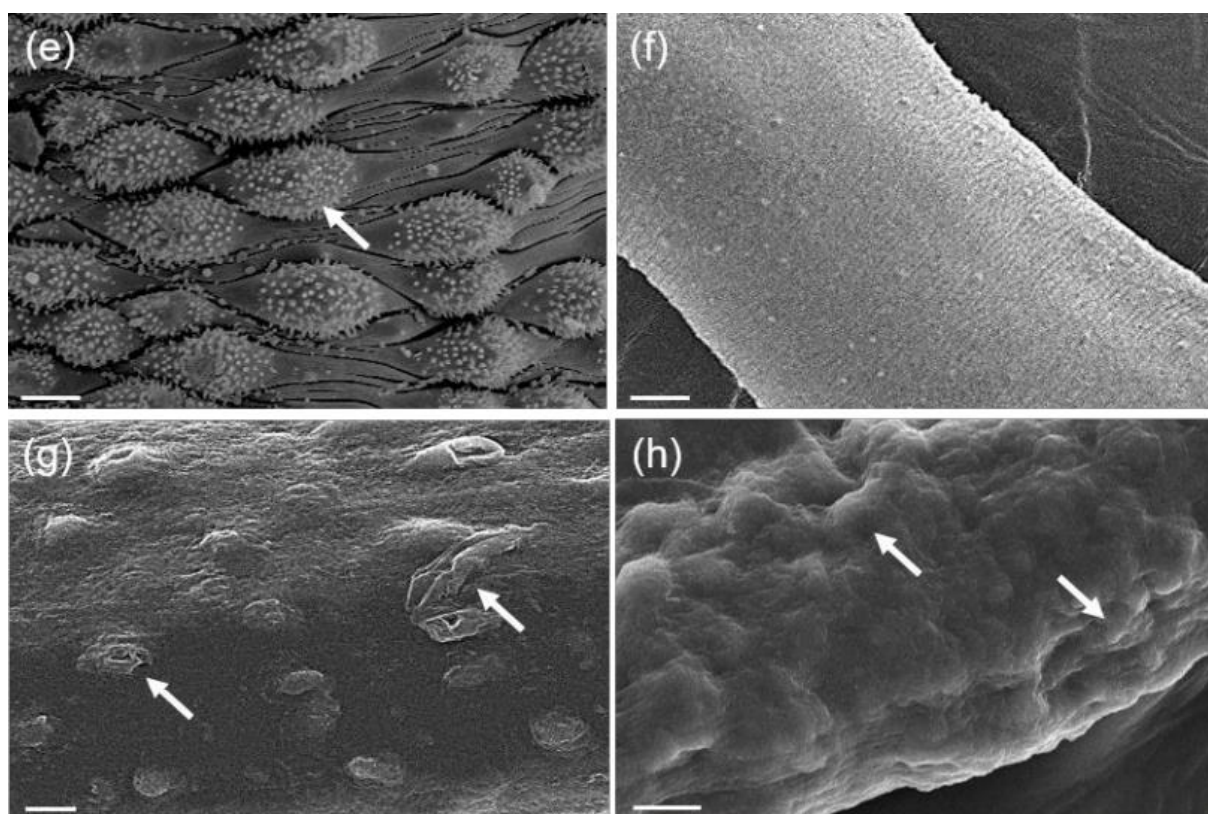
	72	60	30	30	60	60	30
Espironolactona	24	0	0	0	0	0	0
12,5 μM	48	0	0	0	0	0	0
	72	30	0	60	0	30	0

A análise de microscopia de luz revelou alterações na atividade motora, incluindo contrações e redução do comprimento do corpo. (a-d) Imagens de microscopia de luz mostrando a aparência morfológica bruta de adultos de *S. mansoni* após exposição *in vitro* a diferentes concentrações de espironolactona.



Na microscopia eletrônica de varredura observou-se alterações morfológicas, com ruptura do tegumento em todos os vermes analisados. Nos machos tratados foi apresentada alterações nos tubérculos e nas fêmeas teve inchaço no dano tegumentar e erosão da superfície. Como mostrada nas imagens (e-h). Sendo a imagem da figura (e) o controle do macho e a imagem (f) controle da fêmea. O *S. mansoni* foi analisado por meio de microscopia eletrônica de varredura verificando a parte mediana dorsal dos vermes adultos mostrando a perda dos tubérculos e

espinhos na superfície do macho, visto que, na fêmea houve inchaço tegumentar e encurtamento. As imagens foram capturadas usando um Leica Microscópio Microsystems EZ4E, barras de escala = 5 mm (a-d) e um JEOL SM-6460LV. Microscópio Eletrônico de Varredura, escala Barras = 10 μ M (e-h).



CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não obstante a gravidade da esquistossomose e outras helmintíases, os fármacos disponíveis para o tratamento e controle dessas doenças são bastante limitados. Ademais, não há interesse comercial na produção de novos fármacos para doenças parasitárias. Consequentemente, o reposicionamento de fármaco é uma estratégia viável, devido ao baixo custo e redução do tempo de pesquisa. Particularmente, os diuréticos são medicamentos seguros e pouco dispendiosos, e tem sido amplamente utilizado. Apesar de seu mecanismo de ação como anti-helmíntico ainda não ter sido descrito, a espironolactona teve atividade esquistossomicida significativa, causando alterações morfológicas no tegumento de parasitas

adultos. Em conjunto, os resultados mostraram o efeito antiparasitário potencial da espironolactona.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro de Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Marcos P. N. Silva foi bolsista de Mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Josué de Moraes é bolsista Produtividade em Pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

MUTAPI F, MAIZELS R, FENWICK A, WOOLHOUSE M. 2017. Human schistosomiasis in the post mass drug administration era. *Lancet Infect Dis* 17: 42-48.

VALE N, GOUVEIA MJ, RINALDI G, BRINDLEY PJ, GÄRTNER F, CORREIA DA COSTA JM. 2017. Praziquantel for schistosomiasis: single-drug metabolism revisited, mode of action, and resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 61: e02582-16.

LAGO EM, XAVIER RP, TEIXEIRA TR SILVA LM, DA SILVA FILHO AA, DE MORAES J. 2018. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. *Future Med Chem* 10: 89-120.

MAFUD AC, FERREIRA LG, MASCARENHAS YP, ANDRICOPULO AD, DE MORAES J. 2016. Discovery of Novel Antischistosomal Agents by Molecular Modeling Approaches. *Trends Parasitol* 32: 874-886.

JIN G, WONG ST. 2014. Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. *Drug Discov Today* 19: 637- 644.

SICA DA, GEHR TWB, FRISHMAN WH. 2017. Use of diuretics in the treatment of heart failure in older adults. *Heart Fail Clin* 13: 503-512.

DE MORAES J, DE OLIVEIRA RN, COSTA JP, JUNIOR AL, DE SOUSA DP, FREITAS RM, ALLEGRETTI SM, PINTO PL. Phytol, a diterpene alcohol from chlorophyll, as a drug against neglected tropical disease *Schistosomiasis mansoni*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jan 2;8(1):e2617.

SILVA MP, DE OLIVEIRA RN, MENGARDA AC, ROQUINI DB, ALLEGRETTI SM, SALVADORI MC, TEIXEIRA FS, DE SOUSA DP, PINTO PLS, DA SILVA FILHO AA, DE MORAES J. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Sep;50(3):467-472.

DE BRITO, MARIA R.M. ; PELÁEZ, WALTER J. ; FAILLACE, MARTÍN S. ; MILITÃO, GARDENIA C.G. ; ALMEIDA, JACKSON R.G.S. ; ARGÜELLO, GUSTAVO A. ; SZAKONYI, ZSOLT ; FÜLÖP, FERENC ; SALVADORI, MARIA C. ; TEIXEIRA, FERNANDA S. ; FREITAS, RIVELILSON M. ; PINTO, PEDRO L.S. ; MENGARDA, ANA C. ; SILVA, MARCOS P.N. ; DA SILVA FILHO, ADEMAR A. ; DE MORAES, JOSUÉ . Cyclohexene-fused 1,3-oxazines with selective antibacterial and antiparasitic action and low cytotoxic effects. *toxicology in vitro*, v. 44, p. 273-279, 2017.

GUIMARÃES, MARIA A.; DE OLIVEIRA, ROSIMEIRE N. ; DE ALMEIDA, REBECA L. ; MAFUD, ANA C. ; SARKIS, ANA L. V. ; GANASSIN, RAYANE ; DA SILVA, MARCOS P. ; ROQUINI, DANIEL B. ; VERAS, LEIZ M. ; SAWADA, TÂNIA C. H. ; ROPKE, CRISTINA D. ; MUEHLMANN, LUIS A. ; JOANITTI, GRAZIELLA A. ; KUCKELHAUS, SELMA A. S. ; ALLEGRETTI, SILMARA M. ; MASCARENHAS, YVONNE P. ; DE MORAES, JOSUÉ ; LEITE, JOSÉ R. S. A. . Epiisopilosine alkaloid has activity against *Schistosoma mansoni* in mice without acute toxicity. *PLoS One*, v. 13, p. e0196667, 2018.