

Pesquisa Acadêmica

Avaliação do efeito anti-helmíntico do fármaco flunarizina em *Schistosoma mansoni*

Bianca Carlini Silva

ESTUDANTE DE BIOMEDICINA

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE
GUARULHOS

carlinibianca@gmail.com

Ana Carolina Araujo Mengarda

ESTUDANTE DE MESTRADO

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE
GUARULHOS

ana.npdn@gmail.com

Thiago Rahal Moraes

ESTUDANTE DE PÓS DOUTORADO

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE
GUARULHOS

thiago_rahall@hotmail.com

Josué de Moraes

ORIENTADOR

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE
GUARULHOS

moraesnpdn@gmail.com

UNIVERSIDADE UNIVERSUS VERITAS GUARULHOS (UNIVERITAS UNG)

Avaliação do efeito anti-helmíntico do fármaco flunarizina em *Schistosoma mansoni*

1. RESUMO

A esquistossomose representa um grave problema de Saúde Pública no mundo. Considerada uma doença negligenciada, esta afeta as camadas sociais mais baixas, sem condições adequadas de moradia e serviços sanitários. O único fármaco disponível para seu tratamento é o praziquantel, que devido a relatos de resistência e tolerância, sua eficácia chegou em um ponto crucial. Nesse sentido, uma das alternativas pode estar no reposicionamento de fármacos. No presente trabalho foi avaliado o efeito esquistossomicida *in vitro* da flunarizina, um bloqueador dos canais de cálcio recomendando na profilaxia da migrânea. Os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. O fármaco causou 100% de mortalidade nos vermes a partir de 24 horas em concentrações de 50 μ M, 25 μ M e 12.5 μ M. Os resultados demonstram que a flunarizina pode ser uma alternativa promissora para o tratamento da esquistossomose.

PALAVRAS- CHAVE: Esquistossomose; Anti-helmíntico; Reposicionamento.

2. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença parasitária causada por helmintos do gênero *Schistosoma* que, para o homem, têm como os principais agentes etiológicos as espécies *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi* (COLLEY et al., 2014). Considerada uma doença negligenciada, ou seja, uma "doença da pobreza", pois afeta indivíduos de regiões encarecidas de cuidados, sobretudo, saneamento básico adequado, facilitando assim a manutenção do ciclo de vida do parasita. Esta helmintíase é endêmica em mais de 70 países. Estima-se a infecção de mais de 200 milhões de indivíduos no mundo, 800 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção, é responsável por 280.000 a 500.000 mortes anualmente (STEINMANN et al., 2006). No Brasil, é predominante a espécie *S. mansoni* presente em 19 estados. Acredita-se que há em território nacional, entre 6 e 8 milhões de pessoas infectadas e 26 milhões correm o risco de infecção (AMARAL et al., 2006).

O *S. mansoni* tem uma grande capacidade de adaptação, multiplicação e resistência. As fases do ciclo biológico possuem dois períodos de vida parasitária: um no hospedeiro intermediário e outro no hospedeiro definitivo. Entre as fases parasitárias há dois períodos de vida livre em meio aquático: as fases de miracídio que infectam o caramujo e cercaria que são liberadas pelo mesmo na água (GRYSEELS et al., 2006; COLLEY et al., 2014). Resumidamente, o parasita realiza o ciclo assexuado nos moluscos do gênero *Biomphalaria*, enquanto que os espécimes adultos são encontrados nos vasos mesentéricos e no sistema porta de mamíferos. Os vários aspectos patogênicos observados na esquistossomose mansônica dependem da interação parasito-hospedeiro nas três fases evolutivas e migratórias do verme no hospedeiro definitivo: esquistossômulo, verme adulto e ovo. Onde os ovos e a reação granulomatosa são os principais causadores de morbidade (WYNN et al., 2004; WILSON et al., 2007).

Atualmente a quimioterapia é a forma mais eficaz no controle da esquistossomose. Sua ação anti-helmíntica deve-se provavelmente à alteração dos canais de Ca^{2+} dos esquistossomos, aumentando a permeabilidade da membrana do helminto o que leva à intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia espástica. O praziquantel é o único fármaco utilizado para o tratamento da doença, no entanto, além de não atuar nas formas jovens do parasita, existem preocupações quanto à resistência ao fármaco. (FENWICK E WEBSTER, 2006; CIOLI et al., 2014). Além disso, o desenvolvimento de novos fármacos é um processo dispendioso podendo demorar muitos anos para atingir o mercado. Por afetar as camadas sociais mais pobres a doença acaba sofrendo com o descaso da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos fármacos; que, por se tratar de uma população de baixa renda acaba tendo insuficientes opções terapêuticas (MORAES, 2017).

Os problemas citados justificam a pesquisa de novas moléculas para tratamento e profilaxia da esquistossomose, e uma das alternativas pode estar no reposicionamento ou redefinição de fármacos, ou seja, a busca por novos tratamentos através de fármacos já disponíveis no mercado.

Flunarizina, um fármaco utilizado para o tratamento de distúrbios circulatórios cerebrais e de equilíbrio e para prevenção da enxaqueca. Semelhante ao praziquantel, a flunarizina, possui como alvo os canais de cálcio. Portanto, o presente trabalho avaliou o efeito antiparasitário da flunarizina em *S. mansoni*.

3. OBJETIVO

Avaliar o efeito *in vitro* do fármaco flunarizina em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

4. METODOLOGIA

Os ensaios *in vitro* com adultos de *S. mansoni* foram realizados com machos e fêmeas acasalados, cedidos pelo Instituto Adolfo Lutz. Pares de vermes foram lavados 2 vezes com meio RPMI 1640 contendo penicilina 200 U/ml, estreptomicina 200 µg/ml. Posteriormente, os parasitas acasalados foram transferidos em placas para cultura de células com 24 poços contendo, por poço, 1 casal de vermes em 2 ml do meio RPMI 1640, complementado com 10% de soro fetal bovino e tamponado com HEPES 25 mM. Na etapa de triagem, os vermes foram incubados com o composto na concentração de 50 µM. Posteriormente, as amostras ativas foram avaliadas usando as concentrações de (25 µM e 12,5µM) e a concentração letal 50% (CL₅₀) será calculada de acordo com os estudos prévios do nosso grupo (CARVALHO et al., 2014; de Moraes et al., 2015). Em todas as análises opraziquantel 2 µM foi utilizado como controle positivo e poços contendo somente meio de cultura foram usados como controle negativo (MORAES, 2012).

As culturas de vermes adultos foram monitoradas por lupa. Para avaliar a toxicidade dos compostos sobre o *S. mansoni* foram analisados os seguintes parâmetros: motilidade, alterações tegumentares e capacidade reprodutiva (MORAES, 2012). A mortalidade dos vermes foi avaliada pela ausência de movimentos durante 2 minutos ou quando tocados com uma pinça (MORAES, 2012). Após o término do período de incubação (4 dias) ou ocorrência de morte.

5. RESULTADOS PARCIAIS

Nos ensaios *in vitro*, os vermes adultos de *S. mansoni* foram submetidos a concentrações de 50, 25 e 12,5µM de flunarizina, e avaliados por um período de 4 dias. Nas três concentrações avaliadas, foi observado 100% de mortalidade dos vermes a partir de 24 horas, como descrito na **Tabela 1**.

Tabela 1. Efeito *in vitro* do fármaco flunarizina em vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupo	Período de incubação (h)	Mortalidade dos vermes (%) ^a		Redução da atividade motora (%) ^a			
				Leve		Significante	
		M	F	M	F	M	F
Controle	Imediato	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
0.5% DMSO	Imediato	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Praziquantel	Imediato	100	100	0	0	100	100
	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
Flunarizina	Imediato	0	0	0	0	0	0
	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
Flunarizina	Imediato	0	0	0	0	0	0
	24	100	100	0	0	100	100

		48	100	100	0	0	100	100
25 μM		72	100	100	0	0	100	100
	Imediato		0	0	0	0	0	0
Flunarizina		24	100	100	0	0	100	100
12,5 μM		48	100	100	0	0	100	100
		72	100	100	0	0	100	100
*M- Macho *F- Fêmea								

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A esquistossomose é um grave problema de saúde pública, onde seu tratamento se baseia em um único fármaco, o praziquantel. O objetivo do presente projeto foi avaliar a atividade anti-helmíntica da flunarizina, um antagonista do canal de cálcio. Foi observado 100% de mortalidade dos vermes na presença do fármaco em diferentes concentrações. Ademais, serão necessários estudos posteriores como ensaios *in vivo* e análise morfológica do parasita.

7. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à pesquisado Estado de São Paulo (FAPESP), Bianca Carlini Silva recebeu bolsa de Iniciação Científica (PIBIC- UNG). Ana C. Mengarda é bolsista de Mestrado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Thiago Rahal Moraes é bolsista de pós-doutorado (CAPES). Josué de Moraes é bolsista Produtividade em Pesquisa do Conselho Nacional de Desenvolvimento e Tecnológico (CNPq).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [AMARAL,R.S.](#); [TAUIL, P. L.](#); [LIMA, D. D.](#); ENGELS, D. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 79-85, 2006.
- [CARVALHO](#), A. L. A.;MAFUD, A. C.;PINTO, P. L. S.;YVONNE P. MASCARENHAS, Y. P.; MORAES,J.**Schistosomicidal effect of the anti-inflammatory drug diclofenac and its structural correlation with praziquantel**. *Int. J. Antimicrob. Agents*, In Press, 2014.
- CIOLI,D.; PICA-MATTOCCIA.L.; BASSO, A.; GUIDI,A.**Schistosomiasiscontrol: praziquantelforever?***Mol. Biochem. Parasitol.*,v. 195, p. 23-29, 2014.
- COLLEY, D. G.; BUSTINDUY, A. L.; SECOR, W. E.; KING, C. H. **Human schistosomiasis**. *Lancet*, v. 383, p. 2253-2264, 2014
- DE MORAES, J. **Natural products with antischistosomal activity**. *Future Med Chem.*, v. 7, p. 801-820, 2015.
- FENWICH, A.; WEBSTER, J. P. **Schistosomiasis:challenges for control, treatment, and drug resistance**. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v. 19, p. 577-582, 2006.
- GRYSEELS, B.; POLMAN, K.; CLERINX, J.; KESTENS, L.**Humanschistosomiasis**.*Lancet*, v. 368, p. 1106-1118, 2006.
- MORAES, J. **Antischistosomal natural compounds: present challenges for new drug screens**. In: Rodriguez-Morales, A J. ed. *Current Topics in Tropical Medicine*. InTech. Rijeka: p. 333-358, 2012.

MORAES, J. **Doenças Negligenciadas: um problema socioeconômico.** RevSaude. v. 10, p.5-6, 2017.

[STEINMANN, P.](#); [KEISER, J.](#); BOS, R.; TANNER, M.; UTZINGER, J. **Schistosomiasis and water resources development: systematic review meta-analysis, and estimates of people at risk.** Lancet Infect. Dis., v. 6, n. 7, p. 411-425, 2006.

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

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