

DESENVOLVIMENTO DE NANOFORMULAÇÃO PARA O PRAZIQUANTEL: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VIVO* PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE.

1. MARIANA GODOI DE BRITO

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS
UNIVERSIDADE GARULHOS

Mestranda em Ciências pela Universidade Guarulhos

Mrngodoi211@gmail.com

2. ANA CAROLINA A. MENGARDA

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS
UNIVERSIDADE GARULHOS

Ana.npdn@gmail.com

Mestrando em Ciências pela Universidade Guarulhos

3. THIAGO RAHAL MORAIS

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS
UNIVERSIDADE GUARULHOS

thiago_rahall@hotmail.com

Pós-doutoral em Ciências pela Universidade Guarulhos

4. JOSUÉ DE MORAIS

COORDENADOR DO NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS
NEGLIGENCIADAS

moraesnpdn@gmail.com

Pós-Doutorado no Instituto Butantan e Tropical and Public Health Institute (Suíça).

NÚCLEO DE PESQUISAS EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS -NPDN

UNIVERSIDADE GUARULHOS

DESENVOLVIMENTO DE NANOFORMULAÇÃO PARA O PRAZIQUANTEL: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO *IN VIVO* PARA O TRATAMENTO DA ESQUISTOSSOMOSE.

RESUMO

As doenças negligenciadas causadas por helmintos acometem principalmente as camadas sociais pobres, sem condições adequadas de moradia, de trabalho, de educação, de serviços sanitários. Além disso, são conhecidas como “doenças da pobreza”, que acometem mais de 1 bilhão de pessoas no mundo e são responsáveis por milhões de mortes. Para essas doenças, temos algumas opções intervenções terapêuticas que abrange grande parte das patologias. Existem opções terapêuticas para o tratamento dessas patologias, porém o desenvolvimento de novos fármacos é crucial para populações carentes e de baixa renda. mas a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos é ainda crucial para o tratamento do mesmo e assim, atingir população carentes e de baixa renda. Em particular, considerada uma doença negligenciada, a esquistossomose é considerada um importante problema de Saúde Pública em mais de 70 países e o tratamento dessa helmintíase é baseado apenas no uso do praziquantel. Além disso, o praziquantel é comumente usado no tratamento e controle de parasitas em animais domésticos e de produção. Nesse sentido, são preponderantes atividades de pesquisa visando o tratamento da esquistossomose e outras helmintíases de importância médica e veterinária. Para isso, é importante o novo estudo para o desenvolvimento de uma nova formulação do praziquantel, cuja estratégia é baseada no nano-encapsulamento desse fármaco para atingir o alvo com mais eficácia e visar o aproveitamento do medicamento já existente. Considerando que estudos prévios do nosso grupo mostram elevado resultado perante outro medicamento testado, o presente projeto tem como objetivo avaliar o efeito antiparasitário dessa nova formulação em *Schistosoma mansoni*.

PALAVRAS-CHAVE: *Schistosoma mansoni*; Praziquantel; Reformulação.

1. INTRODUÇÃO:

Esquistossomoses são as doenças crônicas causadas por vermes do gênero *Schistosoma* e são relatadas em 80 países do mundo. Os principais agentes etiológicos causadores desta doença são as espécies *S. mansoni*, *S. haematobium* e *S. japonicum*, localizados em diferentes países. O *S. mansoni* tem ocorrência endêmica principalmente na África, América do Sul e alguns locais como Antilhas. Já a espécie *S. haematobium* tem ocorrência no Mediterrâneo e na África. Por fim, a espécie *S. japonicum* está localizada no Extremo Oriente e no Pacífico ^{1,2,3}. O número de pessoas afetadas por estas doenças é superior a 200 milhões e os casos estão localizados principalmente na Ásia e na África.

No Brasil, os casos de esquistossomose são predominantemente causados pela espécie de *S. mansoni*, que afeta 8 milhões, em um total até de 26 milhões de pessoas que podem estar infectadas, sendo que o agravamento do quadro clínico no homem depende da carga parasitária e da condição do indivíduo ^{19,7}. Além disso, conforme seu agravamento, tornou-se um problema de saúde pública, afetando principalmente pessoas que vivem em condições precárias das áreas endêmicas do País.

No controle e combate a esta patologia, temos algumas intervenções comuns no mundo, como o praziquantel. Desde os anos 70, o praziquantel (PZQ) é o medicamento que mostrou eficácia contra as infecções de vários trematódeos e cestódeos, inclusive contra a esquistossomose, permanecendo em uso de drogas por 40 anos. A ação farmacológica se dá através da alteração dos canais de Ca^{2+} dos esquistossomos, aumentando a permeabilidade da membrana do helminto, principalmente o cálcio que resulta na atividade muscular, seguida por contração e paralisia. Sua administração é oral e dose única, tendo eficácia contra a espécie *Schistosoma* que acomete o humano.

Por conta disso, o intuito deste projeto é avaliar a atividade anti-esquistomicida utilizando diferentes formulações do praziquantel, suspenso em partículas de nano-emulsão, com o intuito do aumento na biodisponibilidade do fármaco como uma alternativa mais eficaz para o tratamento da esquistossomose, podendo-se até ser destinado para outras infecções parasitárias que tenham uma boa resposta.

2. OBJETIVOS:

- Avaliar o efeito anti-helmíntico do praziquantel *in vitro* e em camundongos experimentalmente infectados com *Schistosoma mansoni*.

3. METODOLOGIA:

3.1 Animais

Mantém um ciclo de moluscos do gênero *Biomphalaria* em laboratório, onde são infectados com miracídeos recém eclodidos de ovos, através de uma técnica de exposição à luz realizada no Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas (NPDN). Os camundongos SWISS recém-desmamados foram obtidos da empresa ANILAB ® para estudos *in vivo*. Espera-se um dia até que os animais se adaptem ao ambiente e após esse tempo iniciamos o procedimento. Os caramujos são expostos à luz, realizando assim a liberação de cercárias para infecção nos camundongos. Os camundongos foram infectados com 80 cercárias de *S. mansoni* (linhagem BH). Todos os animais foram mantidos sob condições ambientais controladas (temperatura 25 ° C, umidade 70%) e tiveram acesso à água filtrada e alimentada com ração para roedores.

3.2. Dados do fármaco

Fármaco	Massa (g/mol)	Log P	Biodisp. Oral	Meia-Vida (T _{1/2})	DL ₅₀ oral (mg/kg)*
Praziquantel	312.413	2.5	80%	0.8-1.5 h	2.454

3.3. Comitê de Ética

Procedimentos envolvendo animais foram realizados de acordo com a legislação brasileira. O protocolo de manutenção do ciclo de vida de *S. mansoni* foi aprovado pelo comitê de ética local em testes em animais.

3.4. Avaliação de medicamentos *in vitro*

Vermes adultos (49 dias), recém recuperados de hospedeiros roedores, foram colocados em pares e lavados cuidadosamente em meio RPMI 1640 mantido a pH 7,5 com 25 mM de HEPES suplementado com 10% de soro fetal bovino e contendo 200 UI / mL de penicilina e estreptomicina 200 µg / mL. Após a lavagem, os esquistossomas foram incubados em uma placa de cultura de células de 24 poços posteriormente colocados em estufa, contendo o mesmo meio a 37 ° C em atmosfera com 5% de CO₂.

O fármaco descrito utilizado para obter concentrações de teste finais de 2 a 0,001 µM em placas de cultura com um volume final de 1 mL. Os parasitas foram mantidos por 72 horas e monitorados a cada 24 horas usando um microscópio invertido. O efeito do medicamento foi avaliado com ênfase nas mudanças na atividade motora dos vermes e na morte dos vermes. Mudanças no acasalamento e produção de ovos também foram avaliadas. Todos esses testes foram realizados em triplicatas

3.7. Análise microscópica do tegumento

Estudos de microscopia eletrônica de varredura (MEV) também foram realizados. O objetivo deste estudo foi observar se a prometazina pode causar alterações morfológicas em esquistossomas adultos recuperados de camundongos. Eles foram extraídos das veias mesentéricas e fígado como descrito acima e foram lavados duas vezes em solução salina tamponada com fosfato e fixados em 1 mL de solução de álcool FAA ou FAA - formalina - ácido acético. Os espécimes foram secos ao ar, montados em fita e banhados a ouro utilizando um dispositivo de revestimento por pulverização de mesa II (Denton Vacuum LLC, Moorestown, NJ). As amostras foram então visualizadas usando uma microscopia eletrônica de varredura JSM-6460LV de alta resolução JEOL (JEOL Ltd., Tokyo, Japan) 20 kV.

4. Resultados:

As nanoformulações de praziquantel exibiu atividade antiparasitária, revelando sua atividade anti-helmíntica da mesma que possa ser dependente da concentração. Foi

feito comparação ao praziquantel normalmente utilizado para se ter uma maior abrangência dos resultados. A concentração das nanoformulações de praziquantel demonstraram um alto efeito no vermes na realização dos experimentos in vitro, tanto nas primeiras horas (24 e 48 horas) como também após esse período, o que demonstrou ser uma possível concentração dose-dependente. Podemos observar conforme a Tabela 1.

Table 1. *In vitro* effects of compounds against 49-day-old adult *Schistosoma mansoni*.

Group	Group	Period of incubation (h)	Dead worms	Motor activity reduction	
			(%) ^a	Slight	Significant
Control	Control	24	0	0	0
		48	0	0	0
		72	0	0	0
PZQ 2 µg/ml	PZQ 6,4 µM	24	100	0	100
		48	100	0	100
		72	100	0	100
Pzq nano 2 µg/ml	Pzq nano 6,4 µM	24	100	0	100
		48	100	0	100
		72	100	0	100
3,04.10-5 µg/ml	0,000097 µM	24	0	0	0
		48	40	40	60
		72	40	40	60
Pzq livre 2 µg/ml	Pzq livre 6,4 µM	24	100	0	100
		48	100	0	100
		72	100	0	100
3,04.10-5 µg/ml	0,000097 µM	24	0	0	0
		48	0	0	0
		72	0	0	0

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

O ensaio *in vitro* demonstrou que os vermes incubados com o fármaco praziquantel apresentaram alterações em sua atividade motora e aumento na mortalidade de maneira dependente da concentração.

Imagens de microscopia eletrônica de varredura indicaram que a estrutura tegumentar estava alterada tanto em machos quanto em fêmeas de *S. mansoni* e intensificou-se progressivamente quando a concentração de cinarizina aumentou. Essas alterações morfológicas foram semelhantes às relatadas em estudos com outros compostos anti-helmínticos.

Esses resultados indicam que as nanoformulações de praziquantel apresentaram um potencial elevado para a esquistossomose, assim como já descrito em nossos estudos com o uso do praziquantel convencional. Mostrou-se também, sua capacidade de atuar nos vermes com uma concentração baixíssima em relação ao praziquantel convencional.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro da 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 CNPq.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

World Health Organization. Schistosomiasis and soiltransmitted helminthiasis: number of people treated in 2016. Weekly Epidemiological Record 2017; 92: 749–760.

Bennett JL1, Day T, Liang FT, Ismail M, Farghaly A. The development of resistance to anthelmintics: a perspective with an emphasis on the antischistosomal drug praziquantel. Exp Parasitol. 1997; 87(3):260-7.

Cioli D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever? Mol Biochem Parasitol. 2014; 195: 23-29.

de Moraes J, Keiser J, Ingram K, Nascimento C, Yamaguchi LF, Bittencourt CR, *et al.* (2013). *In vitro* synergistic interaction between amide piplartine and antimicrobial peptide dermaseptin against *Schistosoma mansoni* schistosomula and adult worms. *Curr Med Chem* **20**: 301-309.

Campelo YDM, Mafud AC, Vêras LMC, Guimarães MA, Yamaguchi LF, Lima DF, *et al.* (2017). Synergistic effects of *in vitro* combinations of piplartine, epiisopiloturine and praziquantel against *Schistosoma mansoni*. *Biomed Pharmacother* **88**: 488-499.