
Pesquisa acadêmica

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIPARASITÁRIO DO ITRACONAZOL: ESTUDOS *IN VITRO*

AUTORES

JÚLIA DO NASCIMENTO FEITOSA
ALUNA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE
GUARULHOS

jujufeitosa08@gmail.com

TAÍS CONCEIÇÃO DA SILVA
ESTUDANTE DE MESTRADO

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE
GUARULHOS

taisnith@hotmail.com

THIAGO RAHAL MORAIS
DOUTOR EM CIENCIA

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE
GUARULHOS

thiago_rahah@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 ANTIPARASITÁRIO DO ITRACONAZOL: ESTUDOS *IN VITRO*

RESUMO

As doenças causadas por helmintos ocorrem principalmente em camadas sociais pobres, geralmente em lugares com condições sanitárias inadequadas. Também conhecidas como “doenças da pobreza”, em particular, a esquistossomose é considerada uma doença negligenciada e considerada um importante problema de Saúde Pública, ocorrendo em mais de 70 países. O tratamento para esta doença é restrito a apenas o uso do praziquantel, considerado eficaz, mas somente no estágio final da doença. Nesse sentido, uma estratégia adotada para acelerar a descoberta de medicamentos é por meio do reposicionamento de fármacos ou redefinição de fármacos, cuja estratégia é baseada em um novo uso terapêutico para medicamentos já existentes. Considerando que estudos prévios do nosso grupo mostram atividade esquistossomicida *in vitro* do itraconazol. Este trabalho vem a contribuir no âmbito da descoberta de novas terapias para o tratamento da esquistossomose.

PALAVRAS-CHAVE: anti-esquistossoma; *S. mansoni*; itraconazol; atividade *in vitro*; fármaco.

INTRODUÇÃO

As doenças denominadas como da “pobreza”, precisamente denominadas de doenças negligenciadas, são enfermidades também causadas por agentes parasitários que acometem as camadas sociais mais pobres, sem circunstâncias justas de saneamento básico, moradia, de educação e trabalho. Essas patologias atingem mais de 1 bilhão de pessoas no mundo, segundo a OMS e são responsáveis por milhões de mortes anualmente. As doenças negligenciadas não só predominam em estados de pobreza, mas também favorecem para a manutenção do quadro de desigualdade, já que representam obstáculos no desenvolvimento desses países (WHO, 2017).

As doenças causadas por helmintos retratam um importante problema de Saúde Pública em variados países. Singularmente, as esquistossomoses, conhecidas também como esquitossomíases ou bilharzioses, os principais agentes etiológicos dessa patologia são as espécies *Schistosoma mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*. O *Schistosoma mansoni* está presente em mais de 50 países nos continentes Africano e Americano, onde é caracterizado pela infecção denominada esquistossomose mansônica (COLLEY *et al.*, 2014).

Estima-se a existência, em todo mundo, de mais de 200 milhões de indivíduos infectados e 800 milhões de pessoas vivem em áreas endêmicas. Esta helmintíase é responsável por 280.000 a 500.000 mortes anualmente (STEINMANN *et al.*, 2006). No Brasil, onde o *Schistosoma mansoni* é dominante, a esquistossomose é típica em 19 estados. Julga-se haver, no território nacional, entre 6 e 8 milhões de indivíduos infectados e 26 milhões correm o risco de infecção (AMARAL *et al.*, 2006).

O praziquantel tem sido estudado experimentalmente em animais desde a década de 1970, mostrando-se eficaz contra infestações de várias espécies de trematódeos e cestódeos. A ação anti-helmíntica do praziquantel ainda não foi totalmente definida. Menciona-se que o fármaco causa alteração dos canais de Ca^{2+} dos esquistossomos, aumentando a permeabilidade da membrana do helminto a certos cátions monovalentes e bivalentes, principalmente o cálcio que leva à intensificação da atividade muscular, seguida por contração e paralisia. O tratamento com praziquantel (40 mg/kg a 60 mg/kg) é eficaz na redução da morbidade, porém os resultados com o uso deste fármaco têm sido menos promissores do que

o esperado. Além de não atuar nas formas jovens do parasita, existem preocupações quanto à resistência ao fármaco (FENWICK E WEBSTER, 2006; CIOLI *et al.*, 2014). Desta maneira, o desenvolvimento de tolerância ou resistência ao praziquantel justifica-se a pesquisa de novas moléculas para tratamento e profilaxia da esquistossomose.

É noção obsoleta que o desenvolvimento de novos fármacos é dispendioso e pode demorar muitos anos para atingir o mercado. Neste seguimento, uma das opções pode estar no reposicionamento de fármacos.

Estudos pilotos realizados pelo nosso grupo identificaram o itraconazol, um fármaco antifúngico, que apresentou ação antiparasitária em adultos de *S. mansoni*. Estritamente, nas concentrações de 12,5; 25 e 50 μM observaram-se mortalidade em todos os helmintos machos e fêmeas no período de 24 horas.

OBJETIVO

Avaliar o efeito *in vitro* do itraconazol nos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

METODOLOGIA

Os ensaios biológicos foram exercidos de acordo com os métodos caracterizados pelo nosso grupo (DE MORAES *et al.*, 2014; DE BRITO *et al.*, 2017). Abreviadamente, os vermes de ambos os sexos foram coletados por dissecação das veias intestinais de camundongos Swiss fêmeas através da 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*, o casal de vermes colocados em cada poço de uma placa de 24 poços contendo meio RPMI suplementado com soro fetal bovino a 10% e antibióticos, depois incubados a 37°C, em atmosfera de CO₂ a 5%. Nas culturas de *S. mansoni* o itraconazol foi incubado nas concentrações de 50; 25 e 12,5 μM . Os parasitas foram monitorados por até 72 horas, os resultados foram avaliados utilizando um microscópio invertido ou lupa observando as mudanças morfológicas, taxa de mortalidade e atividade motora. Vermes incubados em DMSO (0,5%) serviram como controle negativo e 2 μM de praziquantel como controle positivo. 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

O itraconazol apresentou resultados eficientes como atividade antiparasitária nos ensaios *in vitro* revelando atividade anti-helmíntica deste composto, sendo submetido à dose de 12,5 em que sua atividade motora teve redução de 30 %; 25 teve mortalidade de 100% em 48 horas e 50 μ M teve mortalidade 100 % dentro de 24 horas, como observado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Comparação do efeito anti-esquistossoma do itraconazol em diferentes doses frente ao praziquantel em vermes adultos de *S. mansoni*.

Grupo	Período de incubação (h)	Vermes Mortos (%) ^a		Redução da Atividade Motora (%) ^a			
		M	F	Leve		Significante	
				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 2 μ M	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
itraconazol 50 μ M	Imediato	0	0	0	0	0	0
	24	100	0	0	0	100	100
	48	100	0	0	0	100	100
	72	100	0	0	0	100	100
itraconazol 25 μ M	Imediato	0	0	60	60	0	0
	24	30	60	60	30	30	60
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
itraconazol 12,5 μ M	Imediato	0	0	0	0	0	0
	24	0	0	30	0	0	0
	48	0	0	30	30	0	0
	72	0	0	30	30	0	0

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Contudo a gravidade das helmintíases, sobretudo a esquistossomose, o fármaco disponível para o tratamento e controle dessa doença é bastante limitado. Além do desinteresse farmacêutico em se comercializar a produção de novos fármacos para doenças parasitárias. Por conseguinte, o reposicionamento de fármaco é uma estratégia viável, devido ao baixo custo e redução do tempo de pesquisa. Reservadamente, os diuréticos são medicamentos seguros, pouco dispendiosos e tem sido amplamente utilizados. Ainda assim seu mecanismo de ação como anti-helmíntico ainda não ter sido descrito, o itraconazol teve atividade esquistossomicida significativa, causando alterações morfológicas no tegumento de parasitas adultos. Simultaneamente, os resultados apresentaram o potencial efeito antiparasitário do itraconazol.

REFERÊNCIAS

- AMARAL, R. et al. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 101, p.79-85, 2006. Suppl.
- CIOLI, D. et al. Schistosomiasis control: praziquantel forever?. 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 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.
- 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.

-
- FENWICK A.; WEBSTER J.P. Schistosomiasis: challenges for control, treatment, and drug resistance. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, v. 19, p. 577-582, 2006.
- 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.
- 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.
- STEINMANN, P. et al. 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.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected Tropical Diseases.Disponível em http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Acesso em ago/2019.