
Pesquisa Acadêmica

AVALIAÇÃO DO EFEITO ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* DO ÁCIDO CAURENÓICO

GABRIEL VICTOR DOS REIS LEITE

ESTUDANTE DE BACHAREL EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

UNIVERSIDADE GUARULHOS – UNG

gabrielvictorbio@gmail.com

MARCOS PAULO NASCIMENTO DA SILVA

MESTRE EM CIÊNCIAS

UNIVERSIDADE GUARULHOS – UNG

marcos.npdn@gmail.com

DR. JOSUÉ DE MORAES

ORIENTADOR

UNIVERSIDADE GUARULHOS – UNG

moraesnpdn@gmail.com

**NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS - NPDN,
UNIVERSIDADE GUARULHOS - UNG**

AVALIAÇÃO DO EFEITO ESQUISTOSSOMICIDA *IN VITRO* DO ÁCIDO CAURENOICO

RESUMO

A esquistossomose é uma doença causada por parasitas do gênero *Schistosoma* responsáveis por milhares de mortes anualmente. Seu principal agravante é o saneamento básico inadequado. Lamentavelmente o controle terapêutico depende somente de um fármaco, praziquantel. Considerando a dificuldade na descoberta de anti-helmínticos, a alternativa pode estar nos produtos naturais. Nesse sentido, na busca por compostos naturais com potencial anti-helmíntico o estudo em questão tem por objetivo avaliar o efeito antiparasitário do Ácido caurenóico, extraído de *Baccharis retusa* (Asteraceae) em *Schistosoma mansoni*. Os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando vermes adultos, machos e fêmeas de *Schistosoma mansoni* e a análise do efeito antiparasitário com ênfase na viabilidade dos vermes. Os resultados mostraram o efeito anti-helmíntico, tendo em vista a mortalidade de 30% dos vermes machos na análise imediata e 100% com 48 horas de incubação na concentração de 50 µM. Portanto, os resultados do presente estudo demonstram o potencial anti-helmíntico do ácido caurenóico contra *S. mansoni*.

PALAVRAS-CHAVE: Esquistossomose, *Schistosoma mansoni*.

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Negligenciadas são enfermidades causadas por agentes infecciosos e parasitários que ocorrem nas camadas sociais pobres. Essas patologias acometem mais de 1 bilhão de pessoas no mundo e são responsáveis por milhões de mortes anualmente e infelizmente as opções terapêuticas são insuficientes (Botros e Bennett., 2007). Dentre elas, a esquistossomose, doença parasitária causada por vermes helmintos do gênero *Schistosoma* que afeta principalmente as populações pobres na África, Ásia e América Latina, têm sido negligenciadas pela indústria farmacêutica e os governos (Hotez et al., 2006.). Segundo estimativas, cerca de 240 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo, e cerca de 700 milhões de pessoas em risco de infecção, ocorrendo mais de 250 mil mortes por ano

(WHO, 2017). No Brasil é endêmica em 19 estados. Acredita-se haver, entre 6 e 8 milhões de indivíduos infectados e 26 milhões correm o risco de infecção (AMARAL et al., 2006). A transmissão ocorre na presença do homem infectado, em locais com ausência ou saneamento básico inadequado, eliminando ovos do helminto, em ambientes dos caramujos aquáticos, que atuam como hospedeiros intermediários, liberando larvas infectantes do verme nas coleções hídricas utilizadas pelos seres humanos. Outros fatores, além do saneamento, atuam como condicionantes e contribuem para a ocorrência da esquistossomose numa localidade. Entre esses, destacam-se: o nível socioeconômico, moradia, lazer, grau de educação e informação da população exposta ao risco da doença. Esses fatores se relacionam e favorecem a transmissão da doença, em maior ou menor intensidade, de acordo com a realidade local (REY, L et al 2002).

O tratamento disponível para a esquistossomose é limitado ao isoquinolina-pirazino derivado, praziquantel, que foi lançado na década de 1970. Ademais, relatos de resistência ou tolerância ao fármaco foram descritos (Bennett et al., 1996; Liang., 2001; Doenhoff MJ, 2002). Nesse contexto, é fundamental que se busquem alternativas terapêuticas para a prevenção, tratamento e cura da esquistossomose. Nesse sentido, os produtos naturais têm provado ser uma importante fonte de compostos para o desenvolvimento de novas drogas (Newman e Cragg 2012) e compostos naturais com atividade anti-schistosoma tem sido descrito conforme revisado por Moraes, 2015.

Produtos naturais são encontrados em muitos ambientes e produzido por todos os tipos de organismos. Derivados principalmente de plantas, eles têm sido o pilar do tratamento de doenças humanas (Newman e Cragg 2012). As plantas são ricas em uma grande variedade de metabolitos secundários, tais como taninos, terpenos, alcaloides e flavonoides (Cowan et al., 1999; Chan et al., 2016). Ácido caurenóico é um diterpeno caurânico, substância que já foi isolada de diferentes espécies de plantas e diversas atividades biológicas já foram descritas como, antimicrobiana, antrípanossoma, larvicida, analgésica, anti-inflamatória, hipotensora, diurética, hipoglicêmica, anticonvulsivante (MATOS, 2016).

Diante do pressuposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anti-helmintica do ácido caurenóico isolado de *Baccharis retusa* (Asteraceae), utilizando o *S. mansoni* como modelo experimental.

2. OBJETIVO

Avaliar o efeito antiparasitário do ácido caurenóico em vermes adultos de *Schistosoma mansoni*.

3. METODOLOGIA

3.1 Design experimental

Obtenção dos Parasitas

Schistosoma mansoni (linhagem BH) foram obtidos a partir de hamsters experimentalmente infectados *Mesocricetus auratus* (MORAES., 2012). Animais (3 semanas de idade) foram infectados por injeção subcutânea, com cerca de 150 cercárias de *S. mansoni* cada, colhidas a partir de caramujos hospedeiros intermediários *Biomphalaria glabrata* (Moraes 2012) infectados.

Ensaio *in vitro*

Os ensaios *in vitro* com adultos de *S. mansoni* foram realizados com machos e fêmeas acasalados, cedidos pelo Instituto Adolfo Lutz. Os pares de vermes foram lavados 2 vezes com o 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 supracitado, porém suplementado com 10% de soro fetal bovino e tamponado com HEPES 25 mM. Inicialmente, na etapa de triagem, os vermes foram incubados com ácido carenóico na concentração inicial de 50 µM. Posteriormente, será avaliado utilizando diferentes concentrações para obter a concentração letal 50% (CL₅₀) calculada de acordo com os estudos prévios do nosso grupo (DE MORAES et al., 2015). Praziquantel 3 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 considerados os seguintes parâmetros: mortalidade, atividade motora (motilidade) e capacidade reprodutiva (MORAES, 2012).

4. DESENVOLVIMENTO

A esquistossomose, causada por parasitas do gênero *Schistosoma* representa um importante problema de saúde pública. O tratamento da doença consiste no uso de um único fármaco o praziquantel. Além de não atuar nas formas jovens do parasita o surgimento de tolerância ou resistência ao fármaco justifica-se a pesquisa de novas moléculas para tratamento e profilaxia da esquistossomose. Nesse sentido, estudos demonstram que, produtos naturais podem ser considerados como alternativa para o desenvolvimento de novas drogas. Ácido caurenóico, molécula avaliada neste estudo é comumente encontrada em diversas espécies de plantas e, atividades biológicas deste terpeno já foram descritas tais como: antimicrobiana, antitripanossoma, larvicida, analgésica, anti-inflamatória, hipotensora, diurética, hipoglicêmica, anticonvulsivante. Nesse sentido, buscamos avaliar a atividade anti-helmintica deste diterpeno em vermes adultos de *S. mansoni*.

5. RESULTADOS PARCIAIS

Nos ensaios *in vitro*, os parasitas adultos foram submetidos a uma concentração de 50 μ M do ácido caurenóico e avaliados por um período de 72 horas. A análise imediata após adição dos compostos observou-se a redução da motilidade de 30% dos vermes machos em comparação com os controles negativos. Vermes machos foram mais suscetíveis a ação do composto ocorrendo mortalidade de 30% dos vermes machos monitorados logo após adição do composto e 100% após 48 horas de incubação. A mortalidade das fêmeas foi observada após 48 e 72 horas, conforme resultados descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Avaliação da atividade anti-helmintica *in vitro* do Ácido caurenóico

Grupo	Periodo de incubação (h)	Mortalidade (%) ^a		Redução da atividade motora (%) ^a			
				Moderada		Significativa	
		M	F	M	F	M	F
Controle	24	0	0	0	0	0	0
RPMI 1640	48	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0
Controle	24	0	0	0	0	0	0
0.5% DMSO	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
3µM	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100
Ácido caurenóico	Imediato	30	0	30	0	30	0
50 µM	24	30	0	60	0	30	0
	48	100	30	0	0	100	30
	72	100	30	0	60	100	30

M: Macho/ F: Fêmea

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

As helmintíases representam um importante problema de Saúde Pública em diversos países. Particularmente, a esquistossomose, doença causada por parasitas do gênero *Schistosoma*. O tratamento da doença, como descrito anteriormente, consiste no uso de um único fármaco o praziquantel. Utilizado desde 1977 e devido ao seu uso prolongado, existem registros de resistência e tolerância do parasita ao fármaco, somado ao baixo investimento no desenvolvimento de novos tratamentos a busca por moléculas com atividade anti-helmíntica são preponderantes. Nesse sentido, estudos demonstram que produtos naturais podem ser considerados como alternativa para o desenvolvimento de novas drogas, deveras, muitos compostos isolados de plantas provaram ser o esteio da terapia anti-helmíntica.

Em suma, os resultados do presente estudo mostraram o efeito antiparasitário em vermes adultos de *S.mansoni*. Diante dos resultados, conclui-se que o ácido caurenóico apresentou

atividade esquistossomicida *in vitro*. Entretanto, demais estudos são necessários, como o efeito *in vivo* e a análise morfológica do tegumento do parasita por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura e avaliação do mecanismo de ação. Portanto, espera-se com os resultados do presente estudo contribuir para o desenvolvimento de novos produtos com potencial anti-helmintico para o tratamento da esquistossomose.

7. AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro de Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Gabriel V. Leite é bolsista de Iniciação Científica (CNPq) Marcos Paulo Nascimento da Silva é bolsista de Doutorado da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Dr. João Henrique Ghilardi Lago Bolsista de Produtividade em Pesquisa do CNPq - Nível 1D. Dr. 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.. Ananalysis of the impact of the Schistosomiasis Control Programme in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**,v.101, p. 79-85, 2006. Supl. 1.

BENNETT J.L.; DAY, T.; LIANG, F.T.; 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.

CHAN, W.K.; TAN, L.T.H.; CHAN, K.G.; LEE, L.H.; GOH, B.H.Nerolidol: A Sesquiterpene Alcohol with Multi-Faceted Pharmacological and Biological Activities. **Molecules**. 2016, 21, 529

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L.; BASSO, A.; GUIDI, A.Schistosomiasis control: praziquantel forever? **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 195, p. 23-29, 2014.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clin Microbiol Rev**. 1999; 4, 564-82.

COLLEY, D.G.; BUSTINDUY, A.L.; SECOR, W.E.; KING, C.H. Human schistosomiasis. **Lancet**, v. 383, p. 2253-2264, 2014.

DOENHOFF, M.J.; KUSEL, J.R.; COLES, G.C.; CIOLLi, D. Resistance of *Schistosoma mansoni* to praziquantel: is there a problem? **Trans. R. Soc. Trop. Méd.** 2002; 96(5):465-469

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.

LIANG, Y.S.; COLES, G.C.; DOENHOFF, M.J.; SOUTHGATE, V.R. In vitro responses of praziquantel-resistant and -susceptible *Schistosoma mansoni* to praziquantel. **Int J Parasitol.** 2001; 31(11):1227-1235.

MATOS, D.M. **Determinação do perfil farmacocinético e da biodisponibilidade sistêmica do ácido caurenóico em ratos.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). 2016.

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. **Rev. Saude.** v. 10, p.56, 2017.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **J. Nat. Prod.** v.75, pag. 311–335, 2012.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Schistosomiasis.** Geneva, Switzerland: WHO; 2017. Available from: <http://who.int/mediacentre/factsheets/fs115/en/>. [Accessed 21 March 2017].