
Pesquisa Acadêmica

REPOSICIONAMENTO DA METILDOPA COMO AGENTE ANTI-HELMÍNTICO: ESTUDO *IN* *VITRO* COM *SCHISTOSOMA MANSONI*

AUTORES

1. TAÍS CONCEIÇÃO DA SILVA
ESTUDANTE DE MESTRADO

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE GUARULHOS

taisnith@hotmail.com

2. JÚLIA DO NASCIMENTO FEITOSA
ALUNA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE GUARULHOS

Jujufeitasa@gmail.com

3. THIAGO RAHAL MORAIS
DOUTOR EM CIENCIA

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE GUARULHOS

thiago_rahall@hotmail.com

4. JOSUÉ DE MORAES
ORIENTADOR

NÚCLEO DE PESQUISA EM DOENÇAS NEGLIGENCIADAS, UNIVERSIDADE GUARULHOS

moraesnpgdn@gmail.com

UNIVERSIDADE UNIVERSUS VERITAS GUARULHOS (UNIVERITAS
UNG)

RESUMO

Reposicionamento da metildopa como agente anti-helmíntico: estudo *in vitro* com *schistosoma mansoni*

As doenças ditas como negligenciadas são enfermidades que atingem em sua maioria países em subdesenvolvimento, acometendo principalmente as camadas sociais mais baixas em condições precárias de saneamento básico. Segundo a Organização Mundial da Saúde essas patologias atingem mais de 1 bilhão de pessoas em todo mundo, dentre elas está a esquistossomose, uma das mais importantes em termos de taxa de morbidade, afetando 200 milhões de pessoas mundialmente. O tratamento da esquistossomose se limita a apenas um fármaco, o praziquantel. Considerando-se que o financiamento de pesquisas para doenças negligenciadas é limitado e o desenvolvimento de um novo fármaco é um processo moroso e caro, o reposicionamento de fármaco é uma estratégia auspiciosa. No presente estudo, ensaios *in vitro* mostraram que o fármaco metildopa, um anti-hipertensivo, apresentou ação anti-helmíntica frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. A metildopa na concentração de 50 μ M reduziu a atividade motora e causou 100% de morte nos esquistossomos adultos. Em face do exposto, com este projeto pretende-se explorar a possibilidade de reposicionamento do anti-hipertensivo metildopa como agente anti-helmíntico.

PALAVRAS-CHAVE: esquistossomose, helmintíase, metildopa

INTRODUÇÃO

As doenças negligenciadas conhecidas popularmente como “doenças da pobreza” são enfermidades que atingem as camadas sociais mais baixas, sem condições adequadas de saneamento básico, moradia, trabalho e educação. Essas patologias acometem mais de 1 bilhão de pessoas no mundo e são responsáveis por milhares de mortes anualmente. Sabe-se que as patologias causadas por helmintos representam um importante problema de saúde pública em diversos países, e dentre elas a esquistossomose é uma das mais importantes em termos de taxa de morbidade e mortalidade (WHO, 2017).

A esquistossomose também conhecida como bilharziose ou barriga d’água é uma doença infecciosa parasitária negligenciada que atinge milhares de pessoas em 52 países, totalizando 219,9 milhões de pessoas que necessitam de quimioterapia preventiva, dado que, 120,3 milhões são crianças em idade escolar e 99,6 milhões são adultos (WHO, 2017). Trata-se de uma helmintíase causada por parasitas trematódeos do gênero *Schistosoma*, onde há três espécies principais que infectam o ser humano; *Schistosoma haematobium*, *Schistosoma japonicum*, *Schistosoma mansoni*. Decorrem na África e no Oriente Médio, apenas o *S. mansoni* é encontrado nas Américas e o *S. japonicum* na Ásia (COLLEY *et al.*, 2014).

O ciclo biológico desse parasita se inicia quando os vermes adultos de *Schistosoma* que vivem nas veias mesentéricas humano depositam seus ovos, assim sendo eliminados através das fezes (*Schistosoma japonicum* e *Schistosoma mansoni*) ou urina (*Schistosoma haematobium*). Os ovos ao atingirem a água doce eclodem ocorrendo a liberação de miracídios que infectam o hospedeiro intermediário, o caramujo do gênero *Biomphalaria*. No caramujo encontra-se estágios de esporocistos que através de forma assexuada dão origem a milhares de cercárias que serão liberadas na água após 4-6 semanas. Na água elas penetram a pele do hospedeiro definitivo (mamífero) e passam a ser esquistossômulo que após 5-7 semanas se tornam adultos iniciando novamente a deposição de ovos (COLLEY *et al.*, 2014). Como visto na **figura 1**.

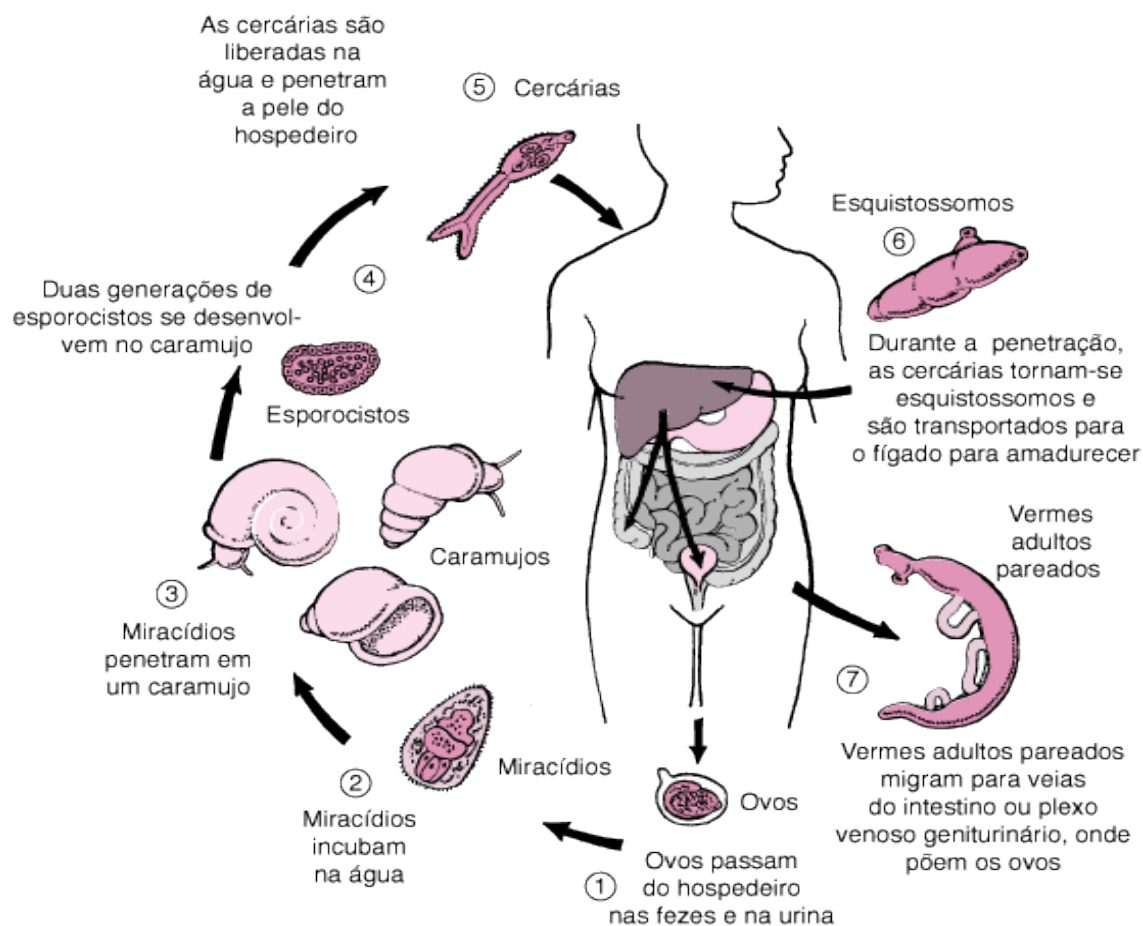


Figura 1: Ciclo de vida do *Schistosoma mansoni*.

Fonte: Manual MSD Ciclo de vida simplificado do *Schistosoma*

A infecção com *Schistosoma* leva a uma série de deficiências crônicas e morbidades, resultando em má nutrição, diminuição das taxas de crescimento, retardo intelectual e déficits cognitivos. (ASHBURN & THOR, 2004) As principais sintomatologias da doença resultam da resposta granulomatosa aos ovos do parasita aprisionados no tecido do hospedeiro. No estágio mais avançado da doença os granulomas podem evoluir para fibrose periportal hepática e hipertensão portal, originando hepato-esplenomegalia o que pode ser fatal (MOLA *et al.*, 1999).

No entanto, o tratamento da esquistossomose se limita a apenas um fármaco, o praziquantel um derivado de pirazino-isoquilina PZQ1 que foi desenvolvido pela Bayer na década de 1970. Este fármaco, administrado oralmente em dose única, atua contra todas as espécies do gênero *Schistosoma* que infectam o homem. O controle e tratamento dessa doença é baseado nesse medicamento há mais de 40 anos (VALE *et al.*, 2017) O PZQ é produzido em

grande escala e é usado principalmente em medicina veterinária. Na medicina humana, é usado essencialmente como quimioterapia preventiva onde programas de tratamento em massa implantam 100 milhões de comprimidos anualmente, e espera-se que haja um crescimento ainda maior na demanda por PZQ nos próximos anos (WOELFLE *et al.*, 2011). Porém existem desvantagens que contribuem para o tratamento ineficiente como diminuição ou ausência completa de atividade contra esquistossomos juvenis e casos de resistência e tolerância devido a administração em massa (VALE *et al.*, 2017; WOELFLE *et al.*, 2011; WANG W *et al.*, 2012).

Sabe-se que a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos é um processo moroso, que pode se estender de 10 a 17 anos até o medicamento ser comercializado e com a probabilidade de sucesso inferior a 10%. Por conseguinte, o reposicionamento de fármaco é uma estratégia auspiciosa pois traz fatores que permitem diminuição de anos de estudos, riscos substanciais e custos, pode oferecer uma melhor compensação de risco versus recompensa em comparação com outras drogas. Rotas mais curtas para os testes clínicos também são possíveis porque processos como, triagem *in vitro* e *in vivo*, otimização química, toxicologia, fabricação em massa, desenvolvimento de formulação e até mesmo início dos testes clínicos foram procedimentos já realizados anteriormente (ASHBURN & THOR, 2004) O reposicionamento de medicamentos é responsável por aproximadamente 30% dos novos medicamentos e vacinas aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) nos últimos anos (JIN & WONG, 2014).

Estudos realizados pelo nosso grupo identificaram metildopa (**Figura 2**), um fármaco anti-hipertensivo, com ação antiparasitária em adultos de *S. mansoni ex vivo*. Especificamente, na concentração de 50 μ M observou-se mortalidade em todos helmintos machos e fêmeas no período de 24 horas. Por outro lado, a ação da metildopa na esquistossomose experimental murina ainda não foi descrita.

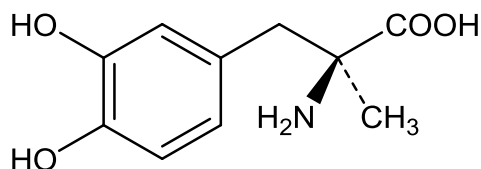


Figura 2: Estrutura molecular metildopa. (Fonte: DrugBank database.)

A Metildopa é um medicamento que pertence a um grupo de fármacos chamado agentes simpatolíticos de ação central, age diminuindo os impulsos do sistema nervoso central que aumentam a pressão arterial (ANVISA, 2014). É um inibidor da descarboxilase de aminoácidos aromáticos em animais e seres humanos. O efeito anti-hipertensivo desse medicamento deve-se ao metabolismo para alfa-metilnorepinefrina, que reduz a pressão arterial por estimulação dos receptores inibitórios alfa-adrenérgicos centrais, falsa neurotransmissão e/ou redução da atividade de renina plasmática (MS, 2013) A Metildopa é fármaco de primeira escolha para o tratamento da hipertensão na gravidez devido à sua relativa segurança com base em relatos sobre a manutenção da estabilidade do fluxo sanguíneo uteroplacental e hemodinâmica fetal e por não mostrar, em um estudo prospectivo de 7,5 anos, nenhum efeito adverso no desenvolvimento das crianças expostas a Metildopa no útero (SWEETMAN, 2003).

Em face do exposto, neste trabalho foi abordado a possibilidade de reposicionamento do anti-hipertensivo metildopa como agente anti-helmíntico.

OBJETIVO

Avaliar o efeito *in vitro* da metildopa 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. O fármaco foi solubilizado em DMSO e diluído 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 metildopa foi incubada na concentração de 50 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 2 μ M de praziquantel como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata.

RESULTADOS

A Metildopa exibiu atividade antiparasitária em uma série de três experimentos. Eles revelaram a atividade anti-helmíntica desse anti-hipertensivo. Após 24 horas de incubação a Metildopa, na concentração de 50 μ M, ocasionou totalidade da morte dos vermes (machos e fêmeas). Como observado na **Tabela 1**.

Tabela 1. Avaliação da porcentagem de morte e atividade motora dos vermes até 72h.

Grupo	Período de incubação (h)	Morte dos vermes (%) ^a		Atividade motora reduzida (%) ^a			
				Leve		Significante	
		M	F	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
Metildopa 50 μM	24	100	100	0	0	100	100
	48	100	100	0	0	100	100
	72	100	100	0	0	100	100

Na análise de microscopia de luz, foi observada alterações na atividade motora, incluindo contrações e redução do comprimento do corpo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Não obstante, além da gravidade da esquistossomose em si, seu tratamento, é limitado a apenas um fármaco, o praziquantel, além disso existem desvantagens que contribuem para o tratamento ineficiente como diminuição ou ausência completa de atividade contra esquistossomos juvenis (estágio pré-patente) e casos de resistência e tolerância devido a administração em massa. 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 e rotas mais curtas para os testes clínicos também se tornam possíveis. Particularmente, a metildopa é um medicamento seguro e tem sido amplamente utilizado em mulheres gestantes. Apesar de seu mecanismo de ação como anti-helmíntico ainda não ter sido descrito, a metildopa teve atividade esquistossomicida significativa, causando alterações morfológicas e morte dos parasitas adultos. Em conjunto, os resultados mostraram o efeito antiparasitário potencial da metildopa.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro de Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP projeto nº 16/22488-3). Taís Conceição da Silva é 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

AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA) MS nº: 1.0235.0564, 23 de junho de 2014.

ASHBURN TT, THOR KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. Nat Rev Drug Discov. 2004 Aug;3(8):673-83.

COLLEY DG, BUSTINDUY AL, SECOR WE, KING CH. Human schistosomiasis. Lancet. 2014 Jun 28;383(9936):2253-64.

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.

HOUWELING TAJ, KARIM-KOS HE, KULIK MC, STOLK WA, HAAGSMA JA, LENK EJ, RICHARDUS JH, DE VLAS SJ. Socioeconomic Inequalities in Neglected Tropical Diseases: A Systematic Review. PLoS Negl. Trop. Dis. 2016, 10 (5), e0004546 1-28.

JIN G, WONG ST. Toward better drug repositioning: prioritizing and integrating existing methods into efficient pipelines. Drug Discov Today. 2014 May;19(5):637-44.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Consultoria Jurídica/Advocacia Geral da União Nota Técnica N°336/2013 Brasília, outubro de 2013.

MOLA PW, FARAH IO, KARIUKI TM, NYINDO M, BLANTON RE, KING CL. Cytokine Control of the Granulomatous Response in *Schistosoma mansoni*-Infected Baboons: Role of Exposure and Treatment. Infect Immun. 1999; 67: 6565-6571.

SWEETMAN S, Ed. Martindale: The Complete Drug Reference. LONDON, PHARMACEUTICAL PRESS ELECTRONIC VERSION, GREENWOOD VILLAGE, (CO), MICROMEDEX, vol.114. ;2003.

VALE N, GOUVEIA MJ, RINALDI G, BRINDLEY PJ, GÄRTNER F, CORREIA DA COSTA JM. Praziquantel for Schistosomiasis: Single-Drug Metabolism Revisited, Mode of Action, and Resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2017 Apr 24;61(5).

WANG W, WANG L, LIANG YS. Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis: a review. *Parasitol Res.* 2012 Nov;111(5):1871-7.

WOELFLE M, SEERDEN JP, DE GOOIJER J, POWWER K, OLLIARO P, TODD MH. Resolution of praziquantel. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Sep;5(9):e1260.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Schistosomiasis and soil-transmitted helminthiasis: numbers of people treated in 2017. *Wkly Epidemiol Rec* 2018;50:681–92.