

Resumo

A esquistossomose é uma doença parasitária que afeta cerca de 250 milhões de pessoas em todo o mundo, representando um desafio global para a saúde pública. O tratamento atual, praziquantel, é limitado em sua eficácia e ameaça o progresso em direção à meta da OMS de erradicar a doença até 2030. Neste estudo, avaliou-se a eficácia da nifuroxazida (NFZ), um antibiótico do grupo dos nitrofuranos, contra o *Schistosoma mansoni*. Foram realizados testes *in vitro*, *in vivo* e teste *in silico*. Resultados *in vitro* mostraram que concentrações de NFZ abaixo de 10 μ M mataram vermes adultos, afetaram o acasalamento, reduziram a produção de ovos e causaram danos ao tegumento dos parasitas. Estudos *in vivo* em camundongos com infecção por *S. mansoni* mostraram que uma única dose oral de NFZ (400 mg/kg) reduziu significativamente a carga total de vermes (~40%) e a quantidade de ovos (~80%) em infecções patententes. Análises *in silico* sugeriram que a NFZ pode agir em quinases de serina/treonina como possíveis alvos. Neste sentido, o estudo destaca a eficácia da NFZ na redução da carga de ovos em casos de infecção por *S. mansoni*, oferecendo uma possível alternativa no tratamento da esquistossomose, essencial para alcançar as metas de saúde pública estabelecidas pela OMS.

Palavras-chave: antiparasitária; esquistossomose; *Schistosoma mansoni*; antihelmíntico; nifuroxazida.

1. Introdução

As helmintíases afetam uma quantidade significativa de indivíduos, alcançando milhões de pessoas em todo o mundo. A exposição ao risco de infecção por pelo menos uma espécie de helminto afeta aproximadamente um quarto da população global. Essas doenças são classificadas como negligenciadas, visto que muitas helmintíases dispõem apenas um fármaco disponível para tratamento. O número de novos medicamentos introduzidos no mercado tem se mantido escassa, especialmente no que diz respeito ao tratamento das doenças negligenciadas (Moraes *et al.*, 2020).

A esquistossomose, uma helmintíase causada por trematódeos do gênero *Schistosoma*, afeta cerca de 240 milhões de pessoas em escala global (WHO, 2022). Atualmente, o tratamento e controle é feito com um único fármaco, praziquantel (PZQ), embora seu desempenho seja considerado satisfatório, a problemática reside no fato de ser a única quimioterapia disponível, visto que casos de resistência ou tolerância têm sido relatados em literatura (Kabuyaya *et al.*, 2018; Zwang, Oliaro, 2017). Além disso, o fármaco demonstra uma farmacocinética deficiente e um perfil de eficácia incompleto, uma vez que sua atividade antiparasitária contra vermes na fase juvenil é ineficaz (Vale *et al.*, 2017).

Nesse sentido, torna-se imprescindível a realização de estudos visando à descoberta de fármacos para o tratamento da esquistossomose. Considerando a dificuldade em encontrar novos compostos com atividade anti-helmíntica, juntamente com a falta de interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de medicamentos para a populações de baixa renda. Visando a necessidade emergente, uma estratégia promissora, é o reposicionamento de fármacos ou redefinição de fármacos, nela conseguimos explorar os medicamentos já estabelecidos no mercado (Pushpakon *et al.*, 2019).

Nesse contexto, a nifuroxazida (NFZ) é um medicamento de amplo espectro utilizado como agente antibacteriano desde 1966 (Bailly *et al.*, 2019). É frequentemente prescrito para o tratamento de diarreias infecciosas agudas ou crônicas causadas por bactérias, como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Shigella*, entre outras, e é eficaz contra certos parasitas intestinais, como a *Giardia lamblia*.

Nessa conjuntura estudos pilotos conduzidos por nossa equipe demonstraram que a nifuroxazida (Figura 1) apresentou efeito anti-helmíntico *in vitro* contra vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Para o ensaio, os esquistossomos foram retirados de camundongos infectados há 49 dias por meio de perfusão (Mengarda *et al.*, 2020). A

nifuroxazida foi testada em concentrações variando de 12,5 a 50 μM , e o fármaco causou 100% de mortalidade nos vermes em concentrações de até 25 μM .

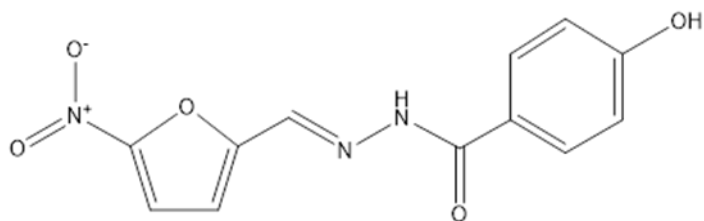


Figura 1. Estrutura química da nifuroxazida

2. Abstract

Schistosomiasis is a parasitic disease that affects approximately 250 million individuals globally, posing a significant global health challenge. The urgency to develop new antiparasitic agents is evident since, thus far, only one drug, praziquantel, is available, and it has limited effectiveness, jeopardizing progress towards the WHO's goal of eliminating the disease as a public health problem by 2030. In this study, an evaluation of the antiparasitic efficacy of nifuroxazide (NFZ), an oral antibiotic belonging to the nitrofuran group, was conducted against *Schistosoma mansoni*. This evaluation encompassed multiple aspects, including *in vitro* assays, *in vivo* experiments, and *in silico* analyses. *In vitro* results indicated that concentrations of NFZ below 10 μ M led to the mortality of adult worms, interfered with the mating process, suppressed egg production, and caused damage to the parasites' teguments. In the context of *in vivo* studies, a single oral dose of NFZ (400 mg/kg) administered to mice with pre-patent or patent *S. mansoni* infections resulted in a substantial reduction in the total worm burden (approximately 40%) and a remarkable decrease in egg quantities (approximately 80%) in patent infections. Furthermore, *in silico* analysis suggested that serine/threonine kinases might serve as potential targets of NFZ in *S. mansoni*. In summary, this study underscores the anti-helminthic properties of NFZ, emphasizing its efficacy in reducing egg burdens in animals with patent *S. mansoni* infections. These findings point to the potential reutilization of NFZ as an antihelminthic agent, offering hope for effective schistosomiasis treatment.

3. Objetivos

Avaliar o efeito anti-helmíntico da nifuroxazida em animais infectados com *S. mansoni* por meio de abordagens *in vitro*, *in vivo* e *in silico*.

4. Metodologia

4.1 Fármacos e reagentes utilizados nos estudos

Meio RPMI 1640, meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal de bezerro inativado pelo calor e soluções de penicilina G-estreptomicina (10.000 U/mL de sal sódico de penicilina G e 10 mg/mL de sulfato de estreptomicina) foram obtidos da Vitrocell, Tampão HEPES, dimetilsulfóxido (DMSO) e brometo de tetrazólio azul de tiazolil (MTT) foram adquiridos da Sigma. O Praziquantel foi gentilmente cedido pela Ecovet Indústria Veterinária Ltda. O NFZ foi sintetizado conforme descrito nos protocolos publicados (Rando DG et al., 2008). Em todas as experiências *in vitro*, os compostos foram solubilizados em DMSO.

4.2 Animais, parasitas e células.

O ciclo de vida de *S. mansoni* (cepa BH) foi mantida rotineiramente por caramujos *Biomphalaria glabrata* e camundongos *Swiss* na Universidade de Guarulhos (UNG, Guarulhos, SP, Brasil), tanto os roedores como os caramujos foram mantidos a 25°C e 50% de humidade com um ciclo artificial de 12 horas/12 horas dia/noite e receberam água e comida. Os camundongos com 4 semanas de idade foram infectados subcutaneamente com cercárias de *S. mansoni*, que foram coletadas de caramujos infectados por *S. mansoni* (de Moraes et al., 2013).

As células Vero (células epiteliais de rim de macaco) foram obtidas da American Type Culture Collection (ATCC CCL-81; Manassas, VA). As células foram cultivadas em DMEM contendo 2 mM de L-glutamina, antibióticos (100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor e foram mantidas a 37°C em atmosfera umidificada contendo CO₂ a 5%. As células foram mantidas em frascos de cultura de 25 cm² e colhidas utilizando tripsina a 0,25% em solução de EDTA a 0,2 g/L (Brito JR et al., 2022).

4.3 Ensaio antiparasitário in vitro .

S. mansoni adulto foi coletado de camundongos por dissecação aos 42 dias pós-infecção e mantido em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 5% de soro fetal de bezerro, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina a 37°C e 5% de CO₂. Os compostos foram diluídos para 50 µM em meio RPMI suplementado em placas de 24 poços, aos quais foi adicionado um verme de cada sexo por poço (de Almeida et al.,2016).

Cada concentração foi testada pelo menos em triplicata e os experimentos foram repetidos três vezes, parasitas incubados com DMSO (0,5%) serviram como controle, a produção de ovos e a viabilidade dos esquistossomos adultos foram avaliadas através de leitura microscópica em 1, 24, 48 e 72 horas (33) utilizando microscópio invertido Motic AE2000 equipado com câmera Motic de ultra-alta definição (UHD) e sistema de monitor 4K-UHD. A morte de esquistossomos adultos foi definida como nenhum movimento observado por pelo menos 1 a 2 minutos de exame, enquanto parasitas com qualquer movimento corporal foram considerados viáveis. A porcentagem de parasitas viáveis foi calculada considerando esquistossomos expostos a compostos versus vermes controle.

4.4 Investigação em microscopia eletrônica de varredura.

Estudos de microscopia eletrônica de varredura foram realizados conforme descrito anteriormente (Silva MP et al.,2021). Resumidamente, os esquistossomas (grupos tratados e controle) foram fixados em glutaraldeído a 2,5% e os espécimes montados foram revestidos com pulverização catódica de ouro e fotografados usando um microscópio eletrônico de varredura JEOL JSM-6460LV.

4.5 Ensaio de citotoxicidade *in vitro*.

O ensaio MTT foi utilizado para avaliar a atividade citotóxica conforme descrito anteriormente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços a uma densidade de 2 x 10³ células/poço na presença de NFZ em diferentes concentrações (começando em 200 µM e seguindo 3 série de diluições dobradas) por 72 horas a 37°C e 5% de CO₂. Após a adição da solução de MTT, as células foram mantidas a 37°C durante 4 h. A absorvância foi medida a 595 nm utilizando um espectrofotômetro (Epoch, BioTek Instruments,

Winooski, VT), e a percentagem de células viáveis foi determinada em relação aos poços de controle. Realizadas em triplicata para cada composto de teste, os índices de seletividade (IS) foram calculados dividindo-se a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) obtida nas células com valores de concentração efetiva de 50% (CE₅₀) determinados em esquistossomos (Amorim CR et al., 2020).

4.5 Estudos *in vivo* em camundongos infectados por *S. mansoni*.

30 camundongos Swiss, com 3 semanas de idade, foram infectados por via subcutânea com 80 cercárias cada, os animais foram então divididos aleatoriamente em seis grupos experimentais (cinco camundongos por grupo), e medicamentos (NFZ e PZQ) ou um veículo (etanol a 2% em água) foram administrados por 21 dias (parasita imaturo, infecção pré-patente) ou 42 dias (adulto parasita, infecção patente) pós-infecção por gavagem oral usando uma dose oral única de 400 mg/kg (Mengarda AC et al., 2020).

No 56º dia pós-infecção, os animais de todos os grupos foram eutanasiados com CO₂ os vermes foram colhidos, contados e sexados, a redução da carga de vermes foi calculada e A eficácia terapêutica também se baseou na técnica de oogramas qualitativos e quantitativos do intestino, bem como no método Kato-Katz para exame quantitativo de fezes (Mengarda AC et al., 2021).

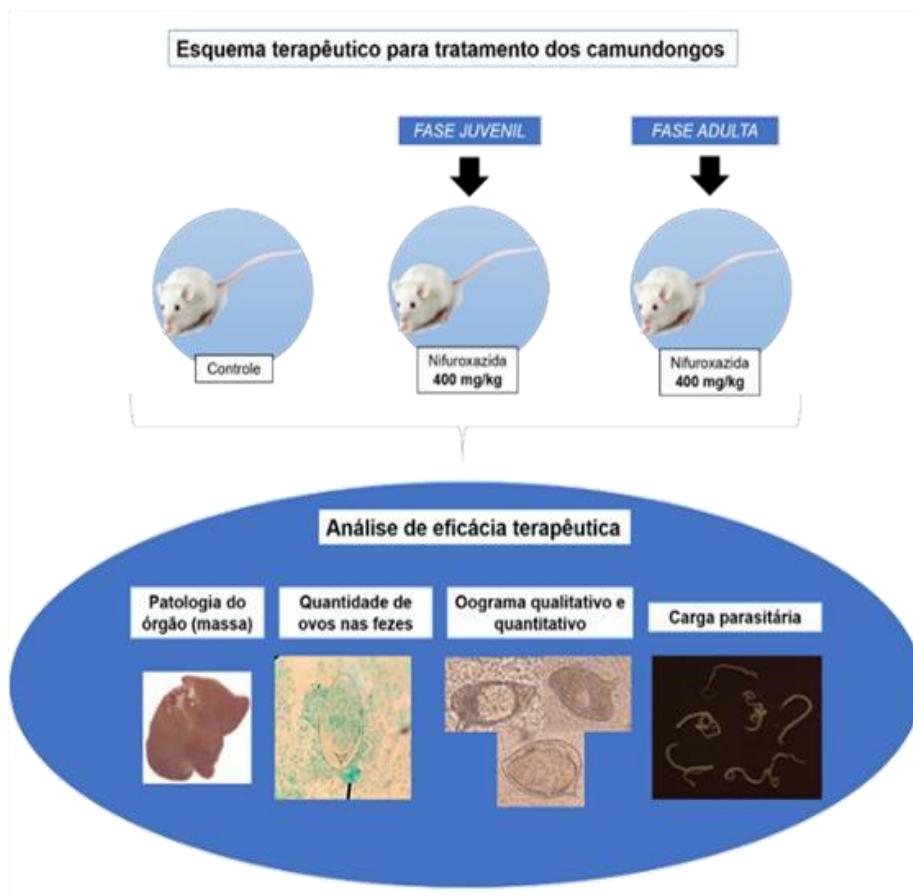


Figura 2. Esquema terapêutico e análise de eficácia terapêutica para ensaios *in vivo*.

Todas as medições de parâmetros (contagem de vermes, oograma quantitativo e qualitativo e exame quantitativo de fezes) foram realizadas por pessoas diferentes (por pelo menos dois investigadores diferentes). Para eliminar preconceitos na interpretação, os manipuladores dos experimentos não eram os mesmos pesquisadores que os analistas de dados (Xavier RP et al., 2020).

4.6 Estudos de pesquisa de alvos macromoleculares.

A estrutura NFZ foi construída usando GaussView 5.0 e otimizada empregando o método *ab initio* HF/6-31G* com energia calculada considerando cargas ChelpG (Gaussian 09W). Um arquivo mol2 foi construído dentro de um conversor babel aberto, considerando ChelpG como as cargas atômicas, e foi inserido no software baseado na Web PharmMapper (Liu Y et al., 2010) para triagem de farmacóforos. As condições de simulação foram ajustadas para “gerar conformadores”, empregando as cargas e a

conformação inicial do arquivo de entrada, examinando o banco de dados do farmacóforo “Todos os alvos” e “recuperando os 300 melhores resultados”.

Os 25 melhores resultados foram analisados por seus valores de pontuação Z e FitScore, e apenas aqueles com os valores mais altos ($<2,5$) foram considerados para o estudo Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). Cada alvo foi então alinhado com proteínas conhecidas e putativas do banco de dados da família Schistosomatidae, através de seus arquivos FASTA (sequências primárias de proteínas), empregando a ferramenta baseada na Web BLAST (Altschul SF et al., 1990).

4.7 estatísticas.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software Graph Pad Prism 8.0, os valores de CE_{50} , CE_{90} e CC_{50} foram calculados utilizando curvas dose-resposta sigmóides (Jesudoss Chelladurai J et al., 2018.). Para a análise experimental dos estudos animais, foi aplicado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis para comparar o grupo controle com o grupo tratado. O nível de significância estatística foi definido como um valor $P < 0,05$. Os dados e a análise estatística atendem às recomendações sobre desenho e análise experimental na área de farmacologia (Lago EM et al., 2019).

4.8 Aprovação ética.

Os estudos em animais são relatados em conformidade com as diretrizes ARRIVE. O protocolo para desenho experimental foi revisado e aprovado pelo Comitê para o Uso Ético de Animais em Experimentação da Universidade de Guarulhos (Guarulhos, SP, Brasil; identificador de protocolo [ID] 47/20) em conformidade com a legislação brasileira de Diretrizes para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório.

5. Desenvolvimento

As doenças da pobreza, formalmente conhecidas como doenças negligenciadas, são enfermidades causadas por agentes infecciosos e parasitários, ocorrem em camadas sociais pobres, e carecem de condições adequadas de moradia, trabalho, educação e serviços sanitários. Nesse contexto, encontram-se as helmintíases, em particular a esquistossomose, classificada como um dos principais problemas de saúde pública mundial, especialmente na maioria dos países africanos, asiáticos e em alguns países da América Central e América do Sul.

Para seres humanos, os principais agentes etiológicos incluem as espécies *S. mansoni*, *S. haematobium*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi* causadores da esquistossomose. Em especial o *S. mansoni* é encontrado na África e no Oriente Médio, sendo também a única espécie presente nas Américas (McManus *et al.*, 2018). Essa doença é transmitida por caramujos hermafroditas de água doce, pertencentes ao gênero *Biomphalaria*, da família Planorbidae. Três espécies de *Biomphalaria* são responsáveis pela transmissão no continente americano: *B. glabrata*, *B. tenagophila* e *B. straminea*.

Os vários aspectos patogênicos e patológicos observados na doença dependem da interação parasito-hospedeiro nas três fases evolutivas e migratórias do verme no hospedeiro definitivo: esquistossômulo, verme adulto e ovo. Os ovos e a reação granulomatosa que os envolve, constituem os principais fatores causadores da morbidade. A infecção por *S. mansoni* geralmente é oligossintomática com predominância intestinal, mas pode produzir alterações anatomopatológicas que abrangem uma ampla gama de situações, conferindo a essa enfermidade um grande polimorfismo e, em muitos casos, um prognóstico incerto (McManus *et al.*, 2018).

Atualmente, a quimioterapia é a forma mais eficaz de controle da esquistossomose, baseada em um único fármaco, o praziquantel. Esse antiparasitário tem sido estudado experimentalmente em animais desde a década de 1980, demonstrando eficácia contra infecções causadas por várias espécies de trematódeos e cestódeos. Apesar de sua eficácia, apresenta limitações quanto as formas jovens do parasita, e há muitos relatos de baixas taxas de cura em regiões endêmicas, o que pode indicar resistência.

Portanto, a pesquisa de novas moléculas para o tratamento e profilaxia da doença é justificada. Estudos pilotos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram atividade anti-helmíntica *in vitro* em vermes adultos de *S. mansoni*. Diante dos resultados promissores estudos *in vivo* são necessários para avaliação mais completa da sua eficaz.

6. Considerações Finais

A nifuroxazida apresentou resultados mais eficazes do que o praziquantel na redução de ovos imaturos no intestino na fase juvenil e na redução de ovos nas fezes na fase adulta. A superfície tegumentar externa do *S. mansoni* é de importância crucial para a sobrevivência do parasita sendo assim, os vermes machos expostos a nifuroxazida apresentaram encurtamento dos tubérculos, corroborando a hipótese de que a superfície do parasita é um dos principais alvos dos agentes antiesquistossomoses. Esses resultados em relação às alterações morfológicas podem ser devidos à alta lipofilicidade do NFZ consequentemente, esse fármaco pode atravessar o tegumento dos esquistossomas e atingir seu(s) alvo(s) molecular(es).

Foi possível observar que o tratamento oral com NFZ é mais eficaz na infecção precoce do que o PZQ. Esses dados sugerem a vantagem de usar NFZ em vez de PZQ em estágios imaturos do *S. mansoni*. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar as propriedades farmacocinéticas e o papel antiesquistossômico do NFZ administrado por via oral.

7. Referencias Bibliográficas

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410.

Amorim CR, Pavani TFA, Lopes AFS, Duque MD, Mengarda ACA, Silva MP, de Moraes J, Rando DGG. 2020. Schiff bases of 4-Phenyl-2-Aminothiazoles as hits to new antischistosomal: synthesis, *in vitro*, *in vivo* and *in silico* studies. *Eur J Pharm Sci* 150:105371.

Bailly C. Toward a repositioning of the antibacterial drug nifuroxazide for cancer treatment. *Drug Discov Today*. 2019;24(9):1930-1936.

Bergquist R, Elmorshedy H. 2018. Artemether and praziquantel: origin, mode of action, impact, and suggested application for effective control of human schistosomiasis. *Trop Med Infect Dis* 3:125.

Brito JR, Wilairatana P, Roquini DB, Parra BC, Gonçalves MM, Souza DCS, Ferreira EA, Salvadori MC, Teixeira FS, Lago JHG, de Moraes J. 2022. Neolignans isolated from *Saururus cernuus* L. (Saururaceae) exhibit efficacy against *Schistosoma mansoni*. *Sci Rep* 12:19320.

de Almeida LM, de Carvalho LS, Gazolla MC, Silva Pinto PL, da Silva MP, de Moraes J, Da Silva Filho AA. 2016. Flavonoids and sesquiterpene lactones from *Artemisia absinthium* and *Tanacetum parthenium* against *Schistosoma mansoni* worms. *Evid Based Complement Alternat Med* 2016:9521349.

de Moraes J, Dario BS, Couto RA, Pinto PL, da Costa Ferreira AM. 2015. Antischistosomal activity of oxindolimine-metal complexes. *Antimicrob Agents Chemother* 59:6648–6652.

Kabuyaya, M., Chimbari, M. J., and Mukaratirwa, S. (2018). Efficacy of praziquantel treatment regimens in pre-school and school-aged children infected with *schistosomiasis* in sub-Saharan Africa: A systematic review. *Infect. Dis. Poverty* 7, 1–7. Doi: 10.1186/s40249-018-0448-x.

Lago EM, Silva MP, Queiroz TG, Mazloun SF, Rodrigues VC, Carnaúba PU, Pinto PL, Rocha JA, Ferreira LLG, Andricopulo AD, de Moraes J. 2019. Phenotypic screening of

nonsteroidal anti-inflammatory drugs identified mefenamic acid as a drug for the treatment of schistosomiasis. *EBioMedicine* 43:370–379.

McManus DP, Dunne DW, Sacko M, Utzinger J, Vennervald BJ, Zhou XN, Schistosomiasis. *Nat. Ver. Dis. Primers*. 2018, 4, 13.

Mengarda AC, Mendonça OS, Morais CS, Cogo RM, Mazloun SF, Salvadori MC, Teixeira FS, Morais TR, Antar GM, Lago JHG, Moraes J. Antiparasitic activity of pipartine (piperlongumine) in a mouse model of schistosomiasis. *Acta Trop.* 2020; 205:105350.

Pushpakom S et al. Drug repurposing: progress, challenges and recommendations. *Nat Ver Drug Discov.* Jan;18, 41-58 (2019).

Rando DG, Avery MA, Tekwani BL, Khan SI, Ferreira EI. Antileishmanial activity screening of 5-nitro-2-heterocyclic benzylidene hydrazides. *Bioorg Med Chem* 2008;16:6724–6731.

Silva BC, Mengarda AC, Rodrigues VC, Cajas RA, Carnaúba PU, Espírito Santo MCC, Bezerra-Filho CSM, de Sousa DP, de Moraes J. Efficacy of carvacryl acetate *in vitro* and following oral administration to mice harboring either prepatent *Schistosoma mansoni* infections. *Parasitol Res.* 2021;120(11):3837-3844.

Silva MP, Silva TM, Mengarda AC, Salvadori MC, Teixeira FS, Alencar SM, Luz Filho GC, Bueno-Silva B, de Moraes J. Brazilian red propolis exhibits antiparasitic properties *in vitro* and reduces worm burden and egg production in a mouse model harboring either early or chronic *Schistosoma mansoni* infection. *J Ethnopharmacol.* 2021; 264:113387.

Vale N, Gouveia M, Rinaldi G, Brindley. Gärtner PF, Correia da Costa J. Praziquantel for schistosomiasis: single-drug metabolism revisited, mode of action, and resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2017, 61, e02582-16.

World Health Organization. (2022). Schistosomiasis.

<https://www.who.int/newsroom/fact-sheets/detail/schistosomiasis> [accessed 03 September 2022]

Xavier RP, Mengarda AC, Silva MP, Roquini DB, Salvadori MC, Teixeira FS, Pinto PL, Morais TR, Ferreira LLG, Andricopulo AD, de Moraes J. H1antihistamines as antischistosomal drugs: *in vitro* and *in vivo* studies. *Parasit Vectors.* 2020;13(1):278.

Zwang, J., and Olliaro, P. (2017). Efficacy and safety of praziquantel 40 mg/kg in preschool-aged and school-aged children: a meta-analysis. *Parasit. Vectors* 10. doi: 10.1186/s13071-016-1958-7.