

Efeito do tratamento com nanopartículas de praziquantel em cisticercos de *Taenia crassiceps*

Larissa Neves Campos^{1*} (IC), Yasmim Rodrigues dos Reis Silva¹ (IC), Nayana Ferreira Lima² (PQ), Marina Clare Vinaud² (PQ), Claudio Javier Salomon³ (PQ), Luciana Damacena Silva¹ (PQ)

*larissanevescampos@gmail.com

- 1) Campus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas (CCET), Universidade Estadual de Goiás (UEG). BR 153 n.3105 CEP: 75132-903, Anápolis, GO.
- 2) Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Universidade Federal de Goiás
- 3) Universidade Nacional de Rosário/Argentina

Resumo: O praziquantel (PZQ) em nanopartículas foi desenvolvido no intuito de melhorar hidrossolubilidade e absorção deste fármaco. Este estudo propôs avaliar a eficácia do praziquantel em nanopartículas no metabolismo energético de cisticercos de *Taenia crassiceps* procedentes do encéfalo de camundongos Balb/C fêmeas. Aproximadamente cinco cisticercos foram implantados cirurgicamente no encéfalo dos camundongos. Trinta dias pós-infecção, os camundongos receberam tratamento com as nanopartículas (NS4, NS5 e NS6) de PZQ, por via oral, sendo eutanasiados 24 hs pós-tratamento para retirada dos cisticercos do encéfalo. O material biológico foi processado, injetado em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e analisado. A detecção de lactato, sugeriu bloqueio das vias mitocondriais após tratamentos com NS4, NS5 e NS6 com preferência pela via anaeróbica. O grupo tratado com NS5 utilizou a via fumarato redutase, indicado pela detecção de citrato, malato e fumarato. A oxidação de ácidos graxos foi sugerida pela detecção de beta-hidroxibutirato nos grupos tratados com NS4 e NS6 e propionato no grupo tratado com NS4. Conclui-se que o parasito fez uso do metabolismo anaeróbio, interpretado pela detecção de lactato e oxidação de ácidos graxos sugerida pela da detecção de beta-hidroxibutirato e propionato.

Palavras-chave: Anti-helmíntico. Neurocisticercose. Nanosuspensões. Metabolismo energético.

Introdução

A neurocisticercose (NCC), causada pelo parasito *Taenia solium* é a principal causa de epilepsia adquirida em países subdesenvolvidos. É também uma das infecções, evitáveis, por helmintos mais comuns do sistema nervoso central (JOHN et al., 2015). Em áreas tropicais, a NCC é responsável por um terço dos distúrbios convulsivos com estimativa de dois milhões de pessoas afetadas (GAGANDEEP; SHARMA, 2017).

Nas últimas décadas avanços consideráveis na compreensão da neurocisticercose foram alcançados usando o modelo experimental *Taenia crassiceps*, “parente próximo” de *T. solium*. Os antígenos de superfície de *T. crassiceps* são utilizados com sucesso para detecção de anticorpos na cisticercose por *T. solium* no soro, líquido pericárdico e líquido céfalo-raquidiano (SCIUTTO et al. 2011). O homem quando infectado por *T. crassiceps* pode desenvolver cisticercose que, se não diagnosticada, pode levar a quadros graves, principalmente quando associada a fatores de imunodepressão como HIV/AIDS e quimioterapia. A abrangência epidemiológica de cisticercose por *T. crassiceps* tende a aumentar de acordo com o crescimento da pandemia de AIDS, podendo se tornar um problema de saúde pública (FRANCOIS et al., 1998).

O tratamento contra essa helmintíase é feito utilizando o praziquantel (PZQ) (ANDREWS et al., 1983), porém, sua baixa solubilidade aquosa pode comprometer a biodisponibilidade desse fármaco por via oral (PASSERINI et al., 2006). Diversas estratégias vêm sendo estudadas e empregadas para melhorar a solubilidade do praziquantel, por exemplo, a sua incorporação a nanopartículas (CHENG et al., 2009; ORLANDI et al., 2012).

O PZQ em nanopartículas apresenta grande potencial para resolver as principais deficiências associadas ao PZQ puro, disponível atualmente no mercado, uma vez que permite modular a liberação do fármaco com maior taxa de absorção pelo organismo, possibilitando o mascaramento do sabor desagradável do medicamento (PALOMARES et al., 2006).

Este estudo propõe determinar os efeitos de três nanopartículas de praziquantel em cisticercos de *T. crassiceps* após o tratamento *in vivo* de camundongos BALB/C infectados intracanalmente.

Material e Métodos

O ciclo biológico de *T. crassiceps* (cepa ORF) tem sido mantido no biotério do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG) desde 2002. Foram seguidos os princípios éticos para a experimentação animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciências Animal Laboratorial (SBCAL). Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal

(CEUA / UFG) (registro Número 037/15). Os camundongos receberam cuidados diários, água acidificada e rações padrão.

O praziquantel em nanoformulações (nanopartículas) foi cedido pelo pesquisador colaborador do projeto, Professor Doutor Cláudio Javier Salomon da Universidade Nacional de Rosário/Argentina.

Para implantação dos cisticercos no encéfalo, os camundongos foram anestesiados com uma solução de Cetamina 100 mg/mL e Xilazina 20 mg/mL na proporção de 0,1 mL/10 g de peso do animal. Uma incisão longitudinal e mediana na pele do crânio foi feita com uma lâmina de bisturi nº 20, após assepsia com iodo tópico. Um orifício foi feito com uma broca (1/8) movida por micromotor na junção sagital superior e sutura transversa, tomando-se cuidado para não lesionar o córtex cerebral com a ponta da broca. Na sequência, os cisticercos foram inoculados com o auxílio de uma agulha. O orifício foi ocluso com alginato de massa dentística e a incisão suturada.

Os camundongos com 30 dias de infecção foram tratados em dose única com as soluções de nanopartículas sólidas diluídas. Foram utilizados cinco camundongos para cada grupo, identificados da seguinte maneira: controle negativo, camundongos infectados e tratados com dose única de solução fisiológica 0,9%; controle positivo, camundongos infectados e tratados com dose única de praziquantel 50 mg/kg; camundongos infectados e tratados com dose única do polímero P-188, 50 mg/kg; camundongos infectados e tratados com dose única do polímero P-407, 50 mg/kg; camundongos infectados e tratados com dose única do polímero PVA, 50 mg/kg; camundongos infectados e tratados com dose única de nanopartícula NS4 (PZQ + P-188), 50 mg/kg; camundongos infectados e tratados com dose única de nanopartícula NS5 (PZQ + P-407), 50 mg/kg e camundongos infectados e tratados com dose única de nanopartícula NS6 (PZQ + PVA), 50 mg/kg.

Os cisticercos retirados do encéfalo dos camundongos foram congelados em nitrogênio líquido e processados para análises bioquímica em cromatografia líquida de alta eficiência seguindo protocolo de acordo com Leandro et al., (2014). Os experimentos foram realizados em três repetições para cada tratamento.

A análise estatística foi realizada utilizando o programa SigmaStat 3.5. Foram aplicadas estatísticas descritivas para determinar a média e o desvio padrão e avaliar as diferenças entre os grupos analisados. As variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. À medida que apresentou distribuição

normal, utilizou-se a análise de variância. As diferenças observadas foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados e Discussão

Este estudo permitiu a detecção de alterações metabólicas em cisticercos de *T. crassiceps* inoculados em cérebro de camundongos BALB /c fêmeas, após tratamento com nanopartículas de praziquantel. Quanto ao peso corporal dos camundongos, não houve diferença estatística ($p > 0,05$) após o tratamento.

Foi possível sugerir um bloqueio das vias mitocondriais após tratamentos com NS4, NS5 e NS6 com preferência pela via anaeróbica, sugerido pela detecção de lactato. O tratamento com NS6 induziu uma redução nos níveis de lactato ($p < 0,05$). O grupo tratado com NS5 utilizou a via fumarato redutase, indicado pela detecção de citrato, malato e fumarato. A oxidação de ácidos graxos foi sugerida pela detecção de beta-hidroxibutirato nos grupos tratados com NS4 e NS6 e propionato no grupo tratado com NS4.

As alterações metabólicas em cisticercos de *T. crassiceps* inoculados na cavidade peritoneal de camundongos tratados nanopartículas de praziquantel foram demonstradas por SILVA et al. (2016), no entanto, este é o primeiro estudo do efeito metabólico de nanosuspensões em cisticercos removidos do encéfalo de camundongos.

É importante ressaltar que a forma mais grave de cisticercose ocorre quando o SNC é afetado, levando a convulsões, epilepsia e morte. Nesse sentido, a melhoria do tratamento atual é de extrema importância. Conforme observado em nossos resultados, as nanosuspensões apresentaram efeitos expressivos no metabolismo do parasito quando comparadas ao PZQ, demonstrado através da não detecção de vias metabólicas importantes, como as mitocondriais.

A via fumarato redutase é descrita como uma via alternativa para produção de energia em condições adversas. O uso desta via foi observado no grupo tratado com NS4 e, não foi observado no grupo controle. Por outro lado, nos grupos tratados com NS4 e NS5, observou-se que o parasito fez uso do metabolismo anaeróbio observado através da detecção de lactato e à oxidação de ácidos graxos, observada através da detecção de beta-hidroxibutirato e propionato. Trata-se de outras vias alternativas usadas por cestóides para garantir a sobrevivência em ambientes hostis, por exemplo, o uso de fármacos ou substâncias tóxicas. A indução da via fumarato

redutase pelo praziquantel puro em neuro cisticercose experimental foi descrita anteriormente por Leandro et al. (2014).

A supressão de vias metabólicas importantes pode ser usada como mecanismo de escape para garantir a sobrevivência do parasito (FRAGA et al., 2016).

Considerações Finais

As três nanopartículas de praziquantel, testadas neste estudo, afetaram o metabolismo energético dos cisticercos de *T. crassiceps*. O grupo tratado com NS5 utilizou a via fumarato redutase, indicado pela detecção de citrato, malato e fumarato. A presença de beta-hidroxibutirato, demonstrou que houve oxidação de ácidos graxos, observado nos grupos tratados com NS4 e NS6 e propionato no grupo tratado com NS4. Conclui-se que o parasito fez uso do metabolismo anaeróbio, interpretado pela detecção de lactato e beta-hidroxibutirato e propionato.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Cláudio Javier Salomon da Universidade Nacional de Rosário/Argentina. Professora Doutora Marina Clare Vinaud, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás (IPTSP/UFG).

Referências

BAIRD, R. et al. Evidence-based guideline: treatment of parenchymal neurocysticercosis: report of the Guideline Development Subcommittee of the American Academy of Neurology. **Neurology**, v.80, p.1424–1429, 2013.

CHENG, L.; GUO, S.; WU, W. Characterization and in vitro release of praziquantel from poly(ϵ -caprolactone) implants. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, n. 1-2, p. 112-119, 2009.

FRAGA, C. M.; DA COSTA, T. L.; DE CASTRO, A. M.; REYNOSO-DUCOING, O.; AMBROSIO, J.; HERNÁNDEZ-CAMPOS, A.; CASTILLO, R., VINAUD, M.C.; A benzimidazole derivative (RCB20) *in vitro* induces an activation of energetic pathways on *Taenia crassiceps* (ORF strain) cysticerci, **Experimental Parasitology**, v. 172, p. 12-17, 2016, doi: 10.1016/j.exppara.2016.11.002.

FRANCOIS, A. et al. *Taenia crassiceps* invasive cysticercosis: a new human pathogen in acquired immunodeficiency syndrome? **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 22, p.488–492, 1998.

GAGANDEEP, S.; SHARMA, R. Controversies in the treatment of seizures associated with neurocysticercosis, **Epilepsy Behav**, v. 33, p. 1-5, 2017. DOI: 10.1016/j.yebeh.2017.05.033.

John, C.C.; Carabin, H.; Montano, S.M.; Bangirana, P.; Zunt, J.R.; Peterson, P.K.; Global research priorities for infections that affect the nervous system. **Nature**, v. 19; n. 527(7578): S178–S186, 2015. doi:10.1038/nature16033.

LEANDRO, L. A.; FRAGA, C. M.; LINO JUNIOR, R. S.; VINAUD, M. C. Partial reverse of the TCA cycle is enhanced in *Taenia crassiceps* experimental neurocysticercosis after in vivo treatment with anthelmintic drugs. **Parasitology Research**, v. 113, n. 4, p. 1313-7, 2014. doi: 10.1007/s00436-014-3770-7.

PALOMARES, F.; PALENCIA, G.; AMBROSIO, J. R.; ORTIZ, A.; COOK, H. J. Evaluation fo the efficacy of albendazole sulphoxide and praziquantel in comination on *Taenia crassiceps*: in vitro studies. **Journal Antimicrob Chemother**, v. 57, p. 482-488, 2006.

SCIUTTO, E.; FRAGOSO, G.; LARRALDE, C. *Taenia crassiceps* as a model for *Taenia solium* and the S3Pvac vaccine. **Parasite Immunology**, v. 33, p. 79–80, 2011. doi:10.1111/j.1365-3024.2010.01257.x

SILVA, L. D.; ARRÚA, E. C.; PEREIRA, D. A.; FRAGA, C. M.; COSTA, T. L.; HEMPHILL, A.; SALOMON, C.J.; VINAUD, M.C. Elucidating the influence of praziquantel nanosuspensions on the in vivo metabolism of *Taenia crassiceps* cysticerci. **Acta Tropica**, v. 161, p. 100–105 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.002>

