



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS

Universidade Estadual de Goiás
Câmpus Anápolis de Ciências Exatas e Tecnológicas – Henrique Santillo - CCET
Curso de Ciências Biológicas

DAYANE AMARAL PEREIRA

**PRAZIQUANTEL - AVALIAÇÃO *IN VIVO* DO EFEITO DE
NANOPARTÍCULAS NO METABOLISMO DE CISTICERCOS DE *TAENIA*
*CRASSICEPS***

Anápolis
2015

DAYANE AMARAL PEREIRA

Praziquantel - Avaliação *in vivo* do efeito de nanopartículas no metabolismo de cisticercos de *Taenia crassiceps*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Estadual de Goiás, CCET, como requisito parcial à obtenção do grau de Biólogo Licenciado.

Orientador: Prof^o. MSc. Leonardo Teófilo Teles

Coorientadora: Prof^a. Dra. Luciana Damacena Silva

Anápolis

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CAMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS –
HENRIQUE SANTILLO
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS – MODALIDADE: LICENCIATURA

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

TÍTULO DO TRABALHO:

PRAZIQUANTEL – AVALIAÇÃO IN VIVO DO EFEITO DE NANOPARTÍCULA NO METABOLISMO DE
CISTICERCOS DE *TAENIA CRASSICEPS*

AUTORA:

DAYANE AMARAL PEREIRA

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DEFENDIDO E APROVADO EM SESSÃO PÚBLICA, NO DIA 01
DE JULHO DE 2015, ÀS 13:00 HORAS, NO CAMPUS ANÁPOLIS DE CIÊNCIAS EXATAS E
TECNOLÓGICAS – HENRIQUE SANTILLO DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS, CUJA BANCA
EXAMINADORA ESTEVE CONSTITUÍDA DOS SEGUINTE MEMBROS:

PROF. MSC. LEONARDO TEÓFILO TELES
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
ORIENTADOR

PROFA. DRA. LUCIANA DAMACENA SILVA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE GOIÁS
CO-ORIENTADORA

MSC. HANSTTER HALLISON ALVES REZENDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

DRA. TATIANE LUIZA DA COSTA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Dedico este trabalho ao meu marido Carlos Eduardo pela compreensão e apoio para a realização do mesmo. À minha mãe Maria Aparecida e ao meu padrasto Eromildo (in memoriam), pelo amor incondicional e confiança que depositaram em mim, durante esse percurso da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida que me concede a cada amanhecer, pela saúde, pela persistência, pelas superações, pela sabedoria, pela paciência, enfim por todos os dons que me fizeram chegar até aqui.

Agradeço ao meu marido, por toda compreensão que teve, pela dedicação, incentivo e apoio emocional que me deu durante esses anos, por nunca ter me deixado desistir, você antes de mim já sabia onde eu chegaria, e eu cheguei. Obrigada por investir em mim.

Agradeço a melhor mãe desse mundo, obrigada por esse amor incondicional que tens por mim, pelo apoio emocional e financeiro, por ser esse exemplo de mulher, de profissional e de mãe que me faz ser melhor a cada dia. Sei que não poupou esforços para que o meu sonho fosse realizado, obrigada.

Agradeço ao meu padrasto Erolmido (*in memorian*), por todo incentivo e apoio dado, infelizmente você não está presente neste momento final, mas sei que sempre sonhou com ele. Obrigada por acreditar em mim.

Agradeço a minha segunda mãe, vovó Faustina, obrigada por todo amor que sente por mim, por todas as marmitas preparadas, por todos os bolos e pães de queijo que me esperavam quentinhos quando chegava da faculdade. Obrigada por cuidar de mim vó.

Agradeço aos meus irmãos Débora, Danubia e João Pedro, por dividirem esse sonho comigo e por todo apoio dado.

Agradeço aos meus colegas de turma, em especial meus padrinhos Tainara, Aline, Raphael e Michelly, são amizades que quero levar para resto da minha vida. Sem vocês eu não teria chegado nem na metade do caminho. Passei por muitas coisas durante o curso, momentos de alegrias até momentos de extrema tristeza e em todos eles vocês estavam ao meu lado, só tenho a agradecer, pela amizade, pelo carinho e por toda ajuda direta ou indiretamente que me deram.

Agradeço aos meus professores por todo conhecimento adquirido no decorrer da minha formação. Em especial quero agradecer aos professores Pedro, Cibele, Vanessa, Andréia Juliana, Cláudio, Héliida, entre outros.

Agradeço a todos os professores e alunos do LAERPH, em especial, Prof^o. Clecildo, Prof^a Marina, Prof^a Ana Maria, Hanstter, Guaraciara, Carolina Fraga e Tatiane, muito obrigada por terem me recebido de forma tão atenciosa e pela disponibilidade de me ajudarem sempre que precisei.

Agradeço ao pesquisador Prof^o Doutor Cláudio Salomon da Universidade Nacional de Rosário/Argentina, por ter cedido gentilmente as nanoformulações do fármaco.

Agradeço ao meu orientador e professor Leonardo Teófilo, obrigada por tudo que me ensinou em sala de aula e por ter aceitado ser meu orientador de última hora.

Agradeço especialmente, a minha coorientadora/orientadora Luciana Damacena, por me orientar, me ensinar, me ajudar, me auxiliar em todos os momentos da graduação e da realização deste estudo. Tive muita sorte por ter sido sua orientanda por três anos, você é um exemplo de dedicação, força de vontade, determinação e profissionalismo. Seu amor pela ciência e pelo ensino me inspira a ser um profissional melhor. Obrigada por toda atenção, palavras de incentivo, críticas e correções dadas, aprendi muito com você.

Enfim, agradeço a toda minha família e amigos que me apoiaram de forma direta ou indiretamente durante esses anos.

RESUMO

O praziquantel (PZQ) é um fármaco comumente utilizado no tratamento de teníase e cisticercose. Alguns estudos têm demonstrado os efeitos do PZQ no metabolismo energético e respiratório do parasito *Taenia crassiceps*, modelo experimental, similar a *T. solium*. Devido ao PZQ apresentar baixa hidrossolubilidade, necessitando então de elevadas doses administradas para atingir o tecido larval do parasito, algumas estratégias vêm sendo estudadas e empregadas para melhorar a solubilidade desse fármaco. As nanopartículas ocupam uma posição de destaque entre os sistemas de liberação de fármacos atualmente disponíveis, por apresentarem estabilidade coloidal, resistência química e serem de fáceis de produção. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito de nanopartícula de PZQ sob os aspectos bioquímicos dos cisticercos de *Taenia crassiceps*. Para a realização dos experimentos foram utilizados 40 camundongos BALB/c fêmeas, infectados por 30 dias com cisticercos de *T. crassiceps*. Os camundongos foram divididos em oito grupos, contendo cinco animais cada, sendo um controle negativo (não tratado com PZQ), um controle positivo (tratado com PZQ convencional), três grupos tratados respectivamente com os polímeros P-188, P-407 e PVA e três grupos tratados respectivamente com as nanoformulações de PZQ, NS4, NS5 e NS6. Os resultados deste estudo revelaram aumento na concentração de glicose e piruvato nos grupos tratados com NS5, comparado ao controle negativo e positivo. Foi observado a inversão parcial do ciclo do ATC, pela ausência ou redução na produção dos ácidos orgânicos citrato e α -cetoglutarato nos grupos tratados com NS4 e NS5. A não detecção de acetato nos grupos tratados com PZQ, P-407 e nos grupos tratados com as nanoformulações sugere o uso da Acetil-CoA para a produção de acetoacetato que foi convertido em β -hidroxibutirato. A ativação do ciclo da ureia foi sugerido pelo aumento na concentração dessa substância nos grupos tratados com NS4 e polímeros P-188, P-407e PVA. Conclui-se que as nanoformulações de praziquantel alteraram o metabolismo dos cisticercos de *T. crassiceps*, principalmente nos grupos tratados com as nanoformulações NS4 e NS5.

Palavras-chave: Nanoformulações de praziquantel, metabolismo energético, *Taenia crassiceps*, tratamento de cisticercose.

ABSTRACT

The praziquantel (PZQ) is a drug commonly used to treat taeniasis and cysticercosis. Some studies have shown the effects of PZQ in the energy and respiratory metabolism of the parasite *Taenia crassiceps*, experimental model to *T. solium*. Due to its low solubility in water PZQ, then requiring high doses administered to achieve tissue larval parasite, some strategies are being studied and used to improve the solubility of PZQ. The nanoparticles occupy a prominent position among drug release systems currently available because they present colloidal stability, chemical resistance and production are easy. Thus, this study aimed to evaluate the effect of nanoparticle PZQ under the biochemical aspects of *Taenia crassiceps*. For the experiments we used 40 female mice BALB /c infected for 30 days with cysticerci of *T. crassiceps*. The mice were divided in eight groups, with five animals each, a negative control (not treated with PZQ), a positive control (treated with conventional PZQ), three groups treated with the polymers P-188, P-407 and PVA and three groups treated with the nanoformulations PZQ, NS4, NS5 and NS6. The results of this study revealed increased concentration of glucose and pyruvate in the groups treated with NS5, compared to negative and positive control. It was observed partial reversal of the TCA cycle, by the absence or reduction in the production of the organic acids citrate and α -ketoglutarate in groups treated with NS4 and NS5. The failure to detect acetate in the groups treated with PZQ, P-407 and in the groups treated with nanoformulations suggests the use of Acetyl-CoA to produce acetoacetate has been converted to β -hydroxybutyrate. Activation of the urea cycle suggested by the increase in the concentration of this substance in the groups treated with NS4 and polymers P-188 and P-407. It is concluded that nanoformulations altered metabolism of praziquantel cysticerci of *T. crassiceps* primarily in the groups treated with the NS4 and NS5 nanoformulations.

Key words: Nanoformulations of praziquantel, energy metabolism, *Taenia crassiceps*, treatment of cysticercosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição geográfica da cisticercose e países em riscos no ano de 2009	13
Figura 2- Ciclo biológico de <i>Taenia crassiceps</i>	14
Figura 3- Fórmula estrutural do praziquantel (PZQ).....	16
Figura 4- Catabolismo de carboidratos em cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	19
Figura 5- Produção e excreção de fumarato, creatinina e ureia em mamíferos	20
Figura 6- Oxidação de ácidos graxos em vertebrados	21
Figura 7- Representação esquemática dos grupos experimentais tratados com nanoformulações de PZQ, após 30 dias de infecção com cisticercos de <i>Taenia crassiceps</i>	23

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1- Ácidos orgânicos da glicólise e glicose produzidos por cisticercos de *Taenia crassiceps* *in vivo* expostos a nanoformulações de praziquantel.....25
- Tabela 2- Ácidos orgânicos do ciclo do ácido tricarboxílico (μm) produzidos por cisticercos de *Taenia crassiceps* *in vivo* expostos a nanoformulações de praziquantel.26
- Tabela 3- Corpos cetônicos (μm), ureia (mg/dL) e creatinina (mg/dL) produzidos por cisticercos de *Taenia crassiceps* *in vivo* expostos a nanoformulações de praziquantel.27
- Tabela 4- Peso pré e pós-tratamento dos camundongos BALB/c fêmeas, infectadas com cisticercos de *Taenia crassiceps*.....28

LISTA DE ABREVIATURAS

ATC	Ciclo do ácido tricarboxílico
ATP	Adenosina trifosfato
CCD	Cisticercose disseminada
IP	Intra-peritoneal
NCC	Neurocisticercose
NS4	Nanopartícula (PZQ + P-188)
NS5	Nanopartícula (PZQ + P-407)
NS6	Nanopartícula (PZQ+ P-PVA)
OAA	Oxaloacetato
P-188	Poloxamer 188
P-407	Poloxamer 407
PEP	Fosfoenolpiruvato
PVA	Poli (álcool vinílico)
PZQ	Praziquantel
S/E	Secreção/Excreção
α-kg	α -cetogluturato
AcAc	Acetoacetato
BHB	β -hidroxibutirato

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1. Cisticercose.....	13
1.2. <i>Taenia crassiceps</i>	14
1.2.1. Epidemiologia	16
1.3. O fármaco Praziquantel	17
1.3.1. Mecanismo de ação do praziquantel	17
1.3.2. Nanopartículas – Sistemas Poliméricos	18
1.4. Metabolismo	19
2. OBJETIVOS.....	23
2.1. Geral	23
2.2. Objetivos específicos.....	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
3.1. Manutenção do ciclo biológico de <i>T. crassiceps</i>	24
3.2. Formulações sólidas de praziquantel.....	24
3.3. Infecção dos camundongos.....	24
3.4. Diluição	24
3.5. Tratamento dos camundongos	25
3.6. Análise bioquímica dos cisticercos.....	26
3.7. Análise estatística	26
4. RESULTADOS	27
4.1. Glicólise.....	27

4.2. Ciclo do Ácido Tricarboxílico (ATC)	28
4.4. Peso dos camundongos pré e pós-tratamento	30
5. DISCUSSÃO	31
6. CONCLUSÃO	33
7. REFERÊNCIAS	34

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cisticercose

A cisticercose é considerada uma doença endêmica em várias partes do mundo. Causa morbidade e mortalidade em seres humanos por apresentar diferentes mecanismos patológicos (BRUNETTI; KERN; VUITTON, 2010). Esta doença ocorre nos continentes, africano, asiático e americano, sendo que na América Latina a cisticercose é endêmica em dez países, incluindo o Brasil (Figura 1). A cisticercose é considerada um problema de saúde pública e há décadas tem sido negligenciada (WHO, 2010).

A doença é causada pela forma larval metacestóide (*Cysticercus cellulosae*) do parasito *Taenia solium*, como consequência da ingestão dos ovos da tênia. O *Cysticercus cellulosae* acomete os suínos e humanos que assumem a condição de hospedeiro intermediário do helminto (NASH; GARCIA, 2011). Geralmente a ingestão de ovos de *T. solium* pelo hospedeiro intermediário é acidental e ocorre em ambientes contaminados com fezes de origem humana (ALMEIDA, 2005).

Os mecanismos de infecção podem ser por heteroinfecção, trata-se da ocorrência mais comum e decorre da ingestão acidental de ovos do parasito. A infecção pode ocorrer ainda por auto-infecção externa ou interna, sendo que na primeira via, ocorre ingestão de ovos de *T. solium* pelo próprio portador da teníase. Na auto-infecção interna em consequência de movimentos antiperistálticos ou de vômitos, algumas proglotes grávidas podem retornar ao estômago e aí sofrer a ação dos sucos digestivos, o que permitirá a eclosão dos embriões infectantes. Ao migrar para o intestino delgado, o cisticerco fixa-se nas vilosidades intestinais penetrando na mucosa, caindo, então, na corrente sanguínea, quando pode ocorrer a infecção de diferentes órgãos e tecidos (GARCIA; DEL BUTTO, 2005; ROPPA, 2006).

A neurocisticercose (NCC) é a forma mais frequente da cisticercose e mais grave, pode ser causada pela presença dos cisticercos de *T. solium* no sistema nervoso central. No sexo masculino é o mais frequente e na maioria dos casos os infectados são oriundos da zona rural (AGAPEJEV, 2003). O quadro clínico clássico é a epilepsia seguida de cefaléia e hipertensão intracraniana, resultante das respostas inflamatórias aos cisticercos em degeneração nos tecidos cerebrais (AGAPEJEV, 2003).

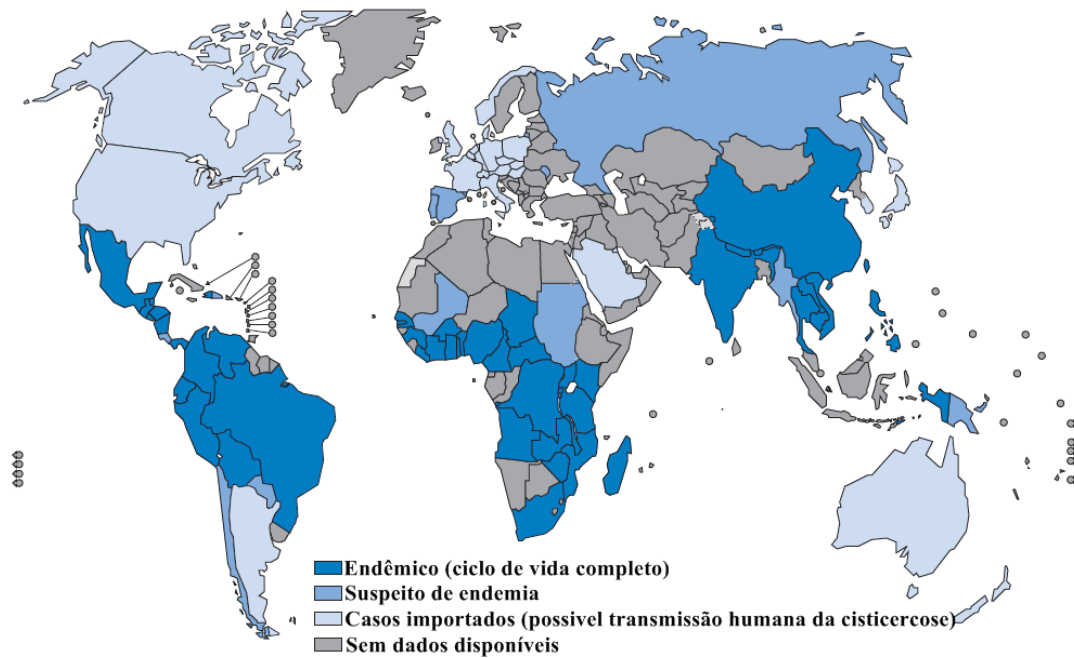


Figura 1- Distribuição geográfica da cisticercose e países em riscos no ano de 2009 (WHO, 2010).

Além de *T. solium*, outros cestodas como *Echinococcus granulosus*, *Taenia saginata* e *Taenia crassiceps* são parasitos de interesse médico-veterinário e tem despertado a atenção de pesquisadores (ALMEIDA, 2005).

1.2. *Taenia crassiceps*

O parasito *T. crassiceps* (Zelder, 1800) Rudolphi, 1810 pertence ao filo Platyhelminthes, classe Cestoda, ordem Cyclophyllidea, Família Taeniidae (WILLMS; ZURABIAN, 2010).

O parasito adulto tem como hospedeiros definitivos canídeos como raposas árticas (*Vulpes lagopus*), lobos (*Canis lupus*), pode infectar cães (*Canis familiares*) e gatos domésticos (*Felis catus*) (WILLMS et al., 2004; WILLMS; ZURABIAN, 2010).

No ciclo de vida de *T. crassiceps* (Figura 2), o helminto adulto que mede de 7 a 14 cm de comprimento, vive principalmente no terço médio do intestino dos hospedeiros definitivos (canídeos silvestres e domésticos), em especial raposas encontradas na América do Norte, Europa e Rússia. As proglotes grávidas, liberadas nas fezes, repletas de ovos, contaminam o meio ambiente (ALMEIDA, 2005; WILLMS; ZURABIAN, 2010). O ovo de *T. crassiceps* é constituído por um embrião que se desenvolve em larva metacestoide (*Cysticercos longicollis*). O cisticerco mede de 4 a 5 mm, podendo atingir até 11 mm de diâmetro, que ao alcançar o trato

digestivo dos hospedeiros intermediários, penetra na mucosa intestinal, ganha a circulação e migra para diversos órgãos (MAILLARD et al., 1998; HELDIWEIN et al., 2006). Embora, o cisticerco possui o canal do escólex, muitos dos brotamentos não apresentam escólex, por isso são incapazes de originar o parasito adulto, a reprodução se dá de forma assexuada, por brotamento, no hospedeiro intermediário (WILLMS; ZURABIAN, 2010; MAHANTY; MADRID; NASH, 2013).

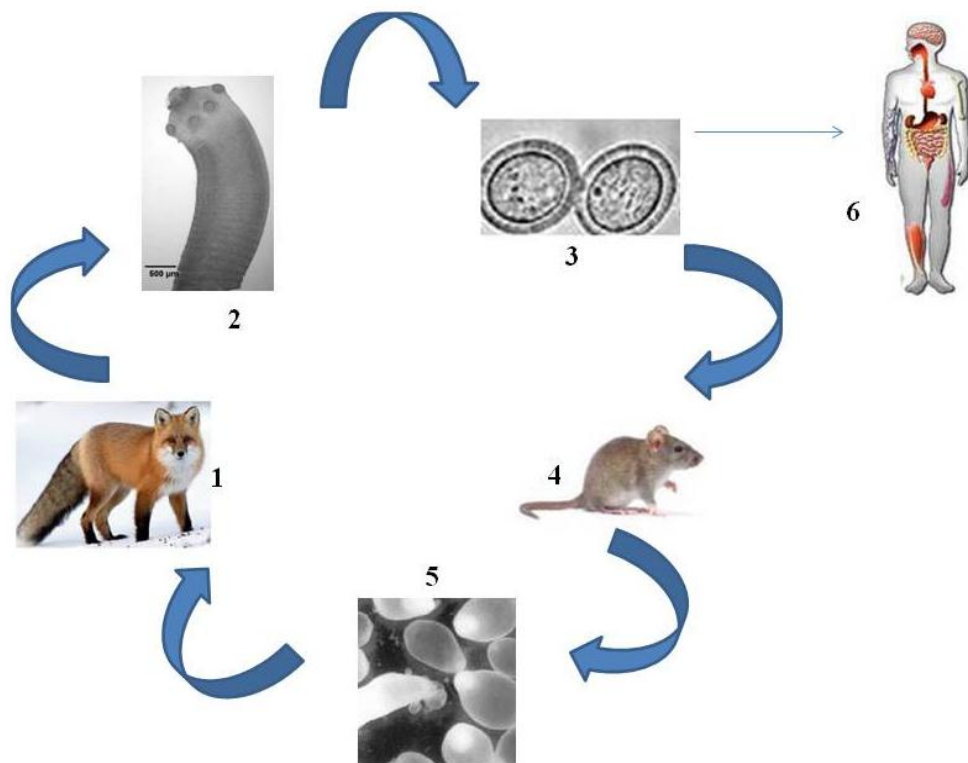


Figura 2- Ciclo biológico de *Taenia crassiceps*. (1) hospedeiro definitivo (canídeos silvestres e domésticos); (2) helminto adulto; (3): ovos de *Taenia* sp; (4) hospedeiro intermediário, em sua maioria, roedores silvestres; (5) forma larval; (6) hospedeiro intermediário acidental (adaptado de WILLMS; ZURABIAN, 2010).

Somente quando as larvas metacestoides são ingeridas pelo hospedeiro definitivo, se desenvolvem em helmintos adultos. A partir de cinco semanas de infecção, os ovos podem ser encontrados nas fezes do hospedeiro definitivo. A infecção se mantém por até nove semanas, evoluindo para cura espontânea (FREEMAN, 1962).

O parasito é hermafrodita, possui o corpo segmentado em proglotes, as quais são classificadas em jovens/imaturas, maduras e grávidas. No verme adulto, a parte superior do corpo do parasito contém o escólex, uma estrutura esférica apresentando quatro ventosas, e o rostelo

com duas fileiras de acúleos, enquanto que o estróbilo é a porção onde se encontra as proglotes, o tamanho e comprimento das proglotes são menores em modelos experimentais comparado com os modelos naturais (WILLMS; ZURABIAN, 2010).

Devido à facilidade de manutenção dos cisticercos de *T. crassiceps* em laboratório, testes laboratoriais *in vivo* e *in vitro*, principalmente utilizando drogas anti-helmínticas tem sido realizados (VINAUD et al., 2009; FRAGA et al., 2012a, 2012b; LEANDRO et al., 2014).

Existem diferentes cepas de *T. crassiceps*, entre estas, as cepas WFU, KBS, HYG e ORF foram isoladas de roedores silvestres (ZURABIAN et al., 2008), no entanto, a cepa ORF tem sido a mais utilizada em estudos experimentais da relação parasito-hospedeiro, os quais vem sendo conduzido com relativa facilidade, o que permite sua manutenção em camundongos, sem a formação dos helmintos adultos, por se tratar de uma cepa estéril (WILLMS; ZURABIAN, 2010). Desta maneira vários estudos da resposta imune de camundongos à infecção por este helminto vêm sendo conduzidos, com enfoques tanto na resposta das primeiras semanas de infecção quanto em períodos mais avançados desta relação (PADILLA et al., 2001).

1.2.1. Epidemiologia

Os animais domésticos como cães e gatos, podem disseminar a cisticercose, por também se comportarem como hospedeiro intermediário de *T. crassiceps* (FLISSER, 1986). Wunschmann et al., (2003) relataram um caso de neurocisticercose em gato doméstico.

Na Alemanha foram relatados dois casos de cisticercose em pessoas do sexo feminino. O primeiro caso, a pessoa tinha 51 anos de idade, residia próximo a uma floresta em companhia de seu cão de estimação. A infecção pode ter sido adquirida por contato próximo com o seu cão, que pode ter se contaminado ao transitar livremente pela floresta (NTOUKAS et al., 2013). O outro caso ocorreu com uma idosa de 82 anos de idade, imunossuprimida, apresentando inchaço na região da mão, onde foi encontrado cisticercos de *T. crassiceps* (HELDWEIN et al., 2006).

Foi relatado no Peru, um caso de cisticercose disseminada (CCD) em uma pessoa do sexo masculino de 82 anos de idade. Os órgãos acometidos foram olho, coração, pulmão, fígado, pâncreas, tecido muscular e o cérebro (NCC) (MAQUETA-AFARAY; CAPAQUIRA; CONDE, 2014).

Medidas profiláticas como evitar contatos próximos com animais de estimação, são medidas fundamentais em regiões endêmicas da cisticercose (NTOUKAS et al., 2013).

1.3. O fármaco Praziquantel

O Praziquantel (PZQ) é um fármaco anti-helmíntico que foi descoberto em 1972 na Alemanha (REICH; GOVINDARAJ, 1998). Quimicamente, o PZQ (Figura 3) é a 2-(ciclohexilcarbonil)-1,2,3,6,7,11b-hexahidro-4H-pirazino[2,1a] isoquinolina-4-ona (BOOTH; DONALD, 1992). Este fármaco foi selecionado entre 400 moléculas com atividade anti-helmíntica para tratamento de doenças parasitárias, como por exemplo, a esquistossomose, a himenolepíase, a difilobotríase, teníase e cisticercose (NOVAES; SOUZA; ARAÚJO, 1999).

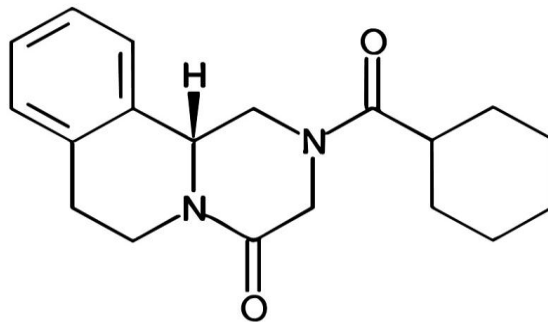


Figura 3- Fórmula estrutural do praziquantel (PZQ).

O PZQ está classificado como fármaco de classe II por apresentar baixa solubilidade aquosa e alta permeabilidade pelas membranas do trato gastrointestinal (SWEETMAN, 2002; LINDENBERG et al., 2004; CHENG et al., 2009). Em doses terapêuticas o PZQ não exerce nenhum efeito no homem, somente no helminto parasito. Alguns efeitos colaterais podem ocorrer, porém são leves, transitórios e de rara importância clínica, pois o PZQ é um fármaco de baixa toxicidade (RANG et al., 2000).

O tratamento com PZQ pode ser realizado de duas formas: a) 50 a 75 mg/kg por duas semanas ou b) um dia de tratamento com uma dose total de 75 mg/kg dividida em três aplicações de 25 mg/kg associada a cimetidina e dieta hiperprotéica para aumentar a absorção e nível plasmático do fármaco (NOGALES- GAETE et al., 2006).

1.3.1. Mecanismo de ação do praziquantel

As atividades anti-cestoda e anti-trematoda do PZQ foram descritas por Thomas e Gönnert (1977). E os primeiros estudos em voluntários humanos foram realizados por Leopold et al. (1978). A indicação do uso de PZQ como fármaco de escolha para tratamento da cisticercose

tem sido relatada por alguns autores, indicando melhora significativa no quadro clínico dos pacientes e, em alguns casos, desaparecimento dos cisticercos (GROLL, 1982; ALARCON, 2006; NOGALES-GAETE et al., 2006). Em casos de infecção por *Taenia* sp, o PZQ pode agir causando lesões no tegumento do helminto adulto, bem como, é eficaz em tratamentos contra a forma larval do parasito, o cisticercos (CASTINEIRAS; MARTINS, 2003).

A ação anti-helmíntica do PZQ deve-se provavelmente à inibição da bomba Na⁺, K⁺ devido ao aumento da permeabilidade da membrana das células do helminto a certos cátions monovalentes e divalentes, principalmente o cálcio. Isso provoca contração da musculatura e, por fim, resulta em paralisia espástica e morte do helminto que se desprende do tecido do hospedeiro (ANGELUCCI et al., 2007; DOENHOFF; CIOLI; UTZINGER, 2008).

Em consequência da baixa solubilidade do PZQ em água (0,4 mg/mL), associado à sua baixa molhabilidade, algumas estratégias vêm sendo estudadas e empregadas para melhorar a solubilidade (LIMA, 2009; CAMPOS, 2013), por exemplo, o desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de fármacos por indústrias farmacêuticas (DAMASCENO et al., 2011; FONSECA, 2012; CAMPOS, 2013). Estes sistemas podem ser administrados por diferentes vias, como o uso oral, intramuscular, injeções subcutâneas, transdérmicos, dentre outros (NGWULUKA, 2010; LANDFESTER et al., 2010). Atualmente existem diferentes sistemas carreadores como lipossomas, hidrogéis, microemulsões, nanopartículas, dispersões sólidas entre outros, ambos os sistemas visam aumentar a biodisponibilidade do fármaco e diminuir a dosagem do medicamento em tratamentos contra parasitoses (FRÉZARD et al., 2005; SANCHEZ; FALCORE; LOPES, 2006; DAMASCENO et al., 2011; FONSECA, 2012; CAMPOS, 2013).

1.3.2. Nanopartículas – Sistemas Poliméricos

O primeiro produto comercial nanoparticulado na área farmacêutica foi o Abraxame® (albumina sérica humana nanoparticulada contendo paclitaxel), que apareceu no mercado no início de 2005 (KREUTER, 2006).

As nanopartículas poliméricas têm sido amplamente utilizadas para a veiculação de fármacos, visto que proporcionam diversas vantagens, como a vetorização e o aumento de solubilidade de substâncias ativas (LANDFESTER et al., 2010). Além da utilização para estabilização de fármacos, proteínas e DNA recombinante frente a agentes como pH e luz, esse sistema de formulação mascara o sabor ruim do fármaco (NGWULUKA, 2010).

A utilização de polímeros solúveis em água, tal como, o poloxamer é considerada como uma alternativa eficiente para aumentar a solubilidade de fármaco de baixa solubilidade. O Poloxamer 407 (P-407), Poli (álcool vinílico) (PVA) e Poloxamer 188 (P-188) estão entre os carreadores utilizados nas nanopartículas. Poloxamer são copolímeros não iônicos de polyoxietileno-polioxipropileno. O segmento de polyoxietileno é hidrofílico enquanto o polioxipropileno é hidrofóbico, em funções destas características podem ser utilizados como agentes tensoativos com as propriedades de diminuir a tensão superficial de um sistema (CIRRI et al., 2004).

1.4. Metabolismo

Metabolismo energético refere-se a processos que resultam na síntese de adenosina trifosfato (ATP). Os helmintos bem como os demais organismos vivos utilizam de um sistema de reações oxi-redução para síntese de ATP (KOHLENER, 1985).

Os cestodas realizam absorção de nutrientes através do tegumento, já que este grupo é desprovido de sistema digestivo. Os substratos energéticos como proteínas, aminoácidos, monossacarídeos, nucleotídeos ou lipídeos são obtidos por transporte ativo e processos de endocitose (MERCHANT et al., 1998).

As vias bioenergéticas utilizadas por parasitos na produção de energia têm relação com o seu habitat no organismo do hospedeiro, por exemplo, os cestodas adultos são anaeróbios, por viverem na luz intestinal do hospedeiro definitivo (ARENAL et al., 2005). A escassez de oxigênio na luz intestinal resulta em algumas limitações metabólicas, onde processos oxidativos, como ciclo do ácido tricarboxílico (ATC) e a cadeia respiratória, são ausentes ou parcialmente ativos. Dessa forma, esses helmintos são incapazes de oxidar compostos orgânicos em CO₂ e água, no entanto, podem apresentar como produtos finais do seu metabolismo compostos como ácidos graxos voláteis e lactato (KOHLENER; VOIGT, 1988).

Os cisticercos de *T. crassiceps* têm metabolismo diferente da fase adulta, apresentando os ácidos orgânicos do ciclo ATC, reforçando a utilização de via metabólica aeróbica pelos metacestodas (VINAUD et al., 2009).

Na glicólise (Figura 4) a glicose é metabolizada a fosfoenolpiruvato que dá origem a oxaloacetato que pode ser convertido a malato que é transportado para a matriz mitocondrial. No citoplasma o fosfoenolpiruvato pode ser convertido a piruvato resultando em malato. Na mitocôndria, o malato é convertido a oxaloacetato ou atuar como precursor do piruvato que dará

origem a acetil-CoA. A interação de acetil-CoA com o oxaloacetato resultará em citrato. O acetil-CoA pode ainda atuar como precursor do acetato, que será excretado. O citrato é convertido a isocitrato que resultará em α -cetoglutarato que dará origem ao succinil-CoA, precursor do succinato. Sob a ação da enzima fumarato redutase o malato pode ser convertido a fumarato, o qual é convertido a succinato, que atua como substrato da cadeia respiratória (ZENKA; PROKOPIC, 1987; CORBIN et al., 1998).

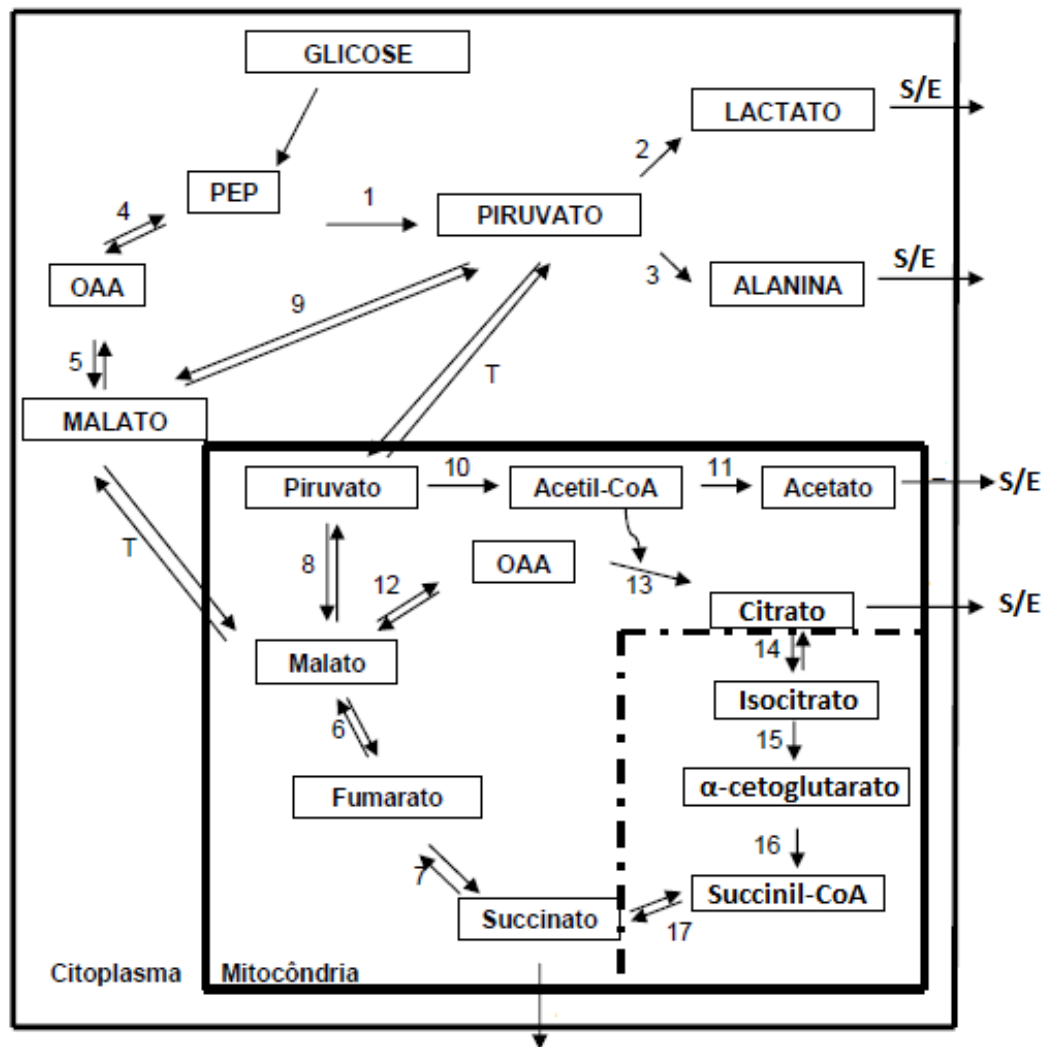


Figura 4- Catabolismo de carboidratos em cisticercos de *Taenia crassiceps*. E. produtos finais do metabolismo secretados/excretados. PEP. Fosfoenolpiruvato. OAA. Oxaloacetato. T. substâncias com trânsito livre pela membrana mitocondrial. 1. Piruvato quinase; 2. Lactato desidrogenase; 3. Alanina transaminase; 4. Fosfoenolpiruvato carboxiquinase; 5. Malato desidrogenase citosólica; 6. Fumarase; 7. Fumarato redutase; 8. Enzima málica mitocondrial; 9. enzima málica citosólica; 10. Complexo da piruvato desidrogenase; 11. acetoacetato descarboxilase; 12. malato desidrogenase mitocondrial; 13. citrato sintase; 14. Aconitase; 15. Isocitrato desidrogenase; 16. α -cetoglutarato desidrogenase; 17. Succinil-CoA sintetase (Adaptado de VINAUD, 2007).

Em condições de aerobiose, o fumarato atua como doador de prótons para a cadeia respiratória e, em condições de anaerobiose, é excretado. Além disso, o fumarato pode também ser produzido no ciclo da ureia (Figura 5), transportado para a mitocôndria e utilizado no ciclo do ácido cítrico (CORBIN et al., 1998).

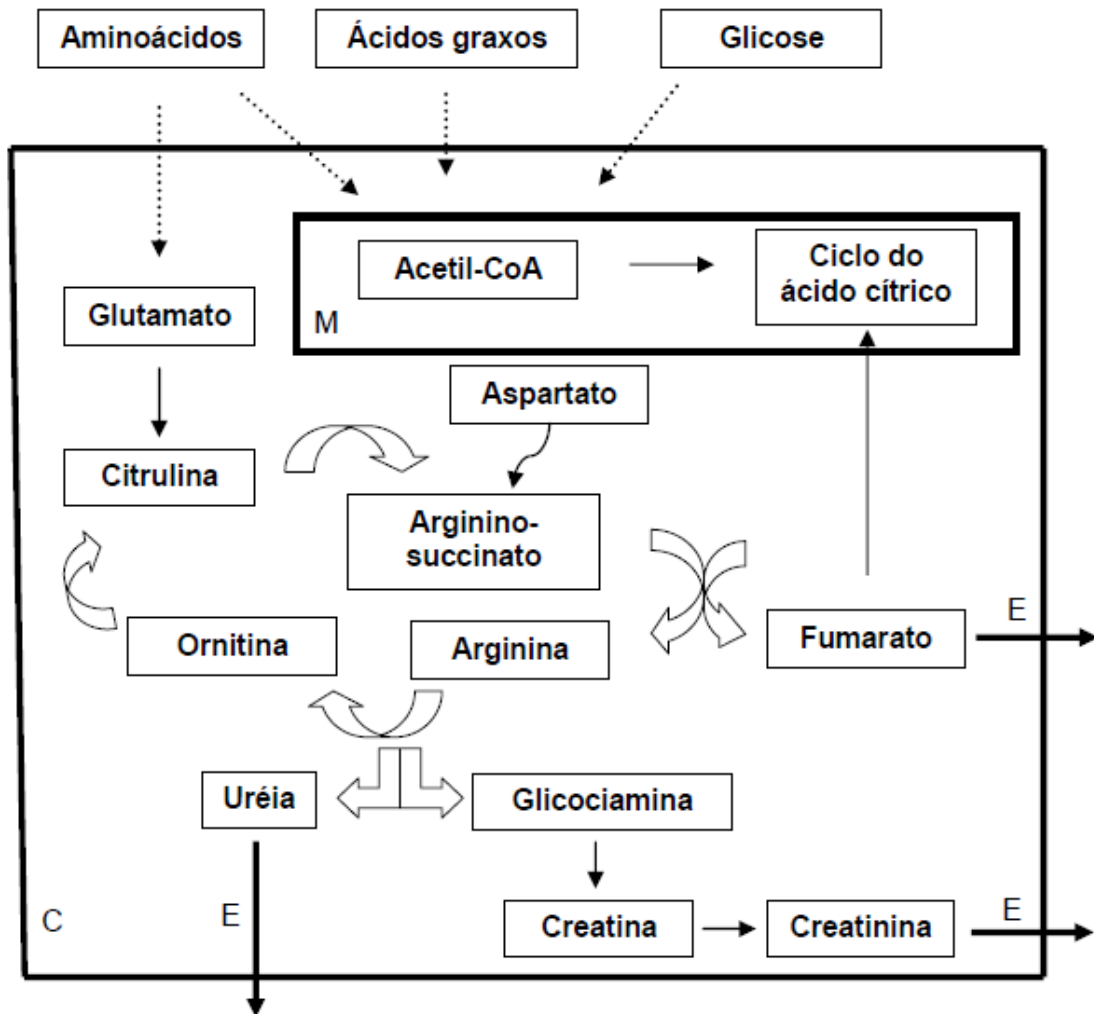


Figura 5- Produção e excreção de fumarato, creatinina e ureia em mamíferos. A oxidação de proteínas, gorduras e carboidratos gera Acetil-CoA utilizado no ciclo do ácido cítrico. O catabolismo de aminoácidos gera glutamato utilizado no ciclo da ureia. C. citoplasma. E. produtos finais do metabolismo excretados. M. mitocôndria. Setas pontilhadas indicam substâncias absorvidas por processo ativo que passam por reações catabólicas no citoplasma (VINAUD, 2007).

Os estudos de Vinaud et al. (2009), demonstraram que sob ação sub-letal de fármacos anti-helmínticos, os cisticercos de *T. crassiceps* utilizaram-se de vias metabólicas alternativas dependente da oxidação dos ácidos graxos (Figura 6) com aumento da S/E de β -hidroxibutirato.

Foi observado ainda que os cisticercos excretam/secretaram ureia através de uma importante via de excreção de substâncias tóxicas. A utilização dessas vias metabólicas pode aumentar as chances de sobrevivências do parasito em ambientes adversos no hospedeiro (WILLMS; ZURABIAN, 2009).

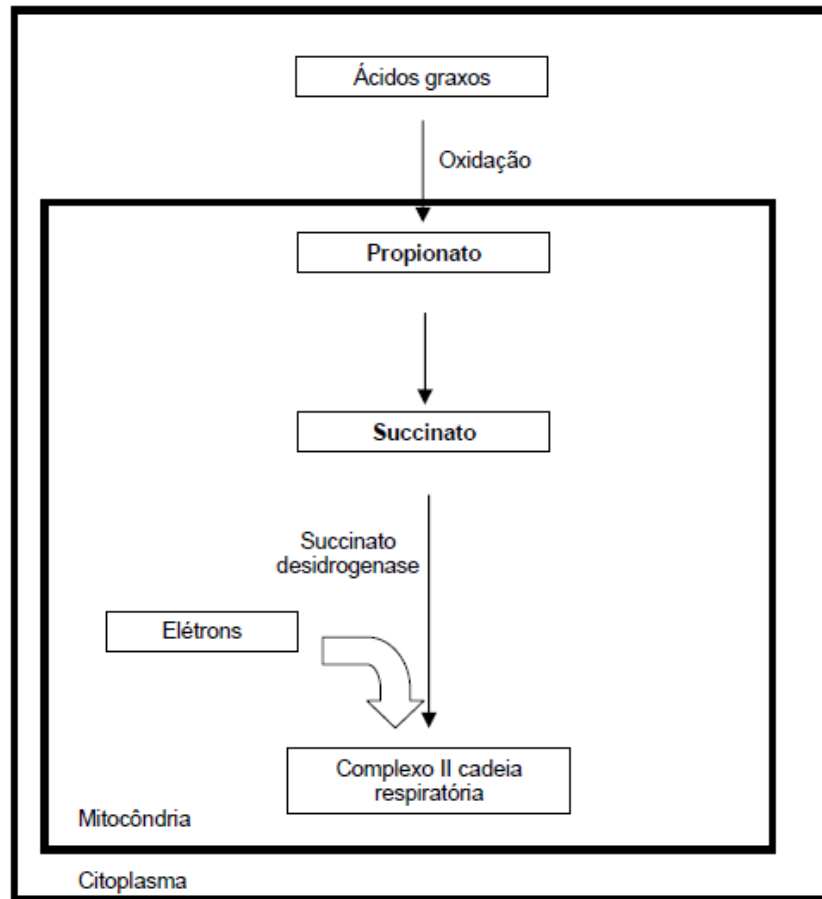


Figura 6- Oxidação de ácidos graxos em vertebrados. A enzima succinato desidrogenase fornece elétrons para o complexo II da cadeia respiratória (VINAUD, 2007).

Dessa forma, algumas estratégias para melhorar a eficácia dos fármacos anti-helmintícos vem sendo desenvolvidas. Nesse sentido, este estudo propõe avaliar as alterações bioquímicas em cisticercos de *Taenia crassiceps in vivo* expostos a formulações sólidas de PZQ. A análise das respostas bioquímicas do parasito diante dessas formulações pode indicar as vias metabólicas utilizadas pelo parasito no desenvolvimento de resistência ao tratamento.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o efeito de nanopartículas do praziquantel sob os aspectos bioquímicos dos cisticercos de *T. crassiceps* procedentes da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas.

2.2. Objetivos específicos

i- Analisar pós-tratamento, *in vivo*, a produção dos ácidos orgânicos que indicam a glicólise aeróbia (piruvato) e glicólise anaeróbia (lactato) por cisticercos de *T. crassiceps* procedentes da via intra-peritoneal de camundongos tratados com praziquantel puro (PZQ), copolímero P-188, copolímero P-407, copolímero PVA e nanopartículas (PZQ + P-188; PZQ + P-407; PZQ + PVA), nas concentrações de 50 mg/kg.

ii- Analisar pós-tratamento, *in vivo*, a produção dos ácidos orgânicos que indicam o ciclo do ácido tricarboxílico (oxaloacetato, citrato, α -cetogluturato, succinato, fumarato e malato por cisticercos de *T. crassiceps* procedentes de via intra-peritoneal de camundongos tratados com praziquantel puro (PZQ), copolímero P-188, copolímero P-407, copolímero PVA e nanopartículas (PZQ + P-188; PZQ + P-407; PZQ + PVA), nas concentrações de 50 mg/kg.

iii- Analisar pós-tratamento, *in vivo*, a produção dos ácidos orgânicos que indicam o metabolismo de ácidos graxos (acetato, β -hidroxibutirato e propionato) por cisticercos de *T. crassiceps* procedentes de via intra-peritoneal de camundongos tratados com praziquantel puro (PZQ), copolímero P-188, copolímero P-407, copolímero PVA e nanopartículas (PZQ + P-188; PZQ + P-407; PZQ + PVA), nas concentrações de 50 mg/kg.

iv- Analisar pós-tratamento, *in vivo*, a produção de ureia e creatinina por cisticercos de *T. crassiceps* procedentes de via intra-peritoneal de camundongos tratados com praziquantel puro (PZQ), copolímero P-188, copolímero P-407, copolímero PVA e nanopartículas (PZQ + P-188; PZQ + P-407; PZQ + PVA), nas concentrações de 50 mg/kg.

v- Analisar, o peso dos camundongos infectados com cisticercos de *T. crassiceps*, pré e pós-tratamento com praziquantel puro (PZQ), copolímero P-188, copolímero P-407, copolímero PVA e nanopartículas (PZQ + P-188; PZQ + P-407; PZQ + PVA), nas concentrações de 50 mg/kg.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Manutenção do ciclo biológico de *T. crassiceps*

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 inoculados 10 cisticercos em estágio inicial na cavidade peritoneal de camundongos fêmea BALB/c de 8 a 12 semanas de idade, onde se multiplicaram por brotamento. Cerca de 90 dias após a inoculação, os animais foram eutanasiados e necropsiados. Foram retirados os cisticercos da cavidade peritoneal, e selecionados 10 em estágio inicial (VINAUD et al., 2008), que foram inoculados em outros camundongos não infectados para dar continuidade ao ciclo (VAZ et al., 1997; ESPINDOLA et al., 2002). Os camundongos receberam cuidados diários, água acidificada e ração padrão para a espécie à vontade. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás, sob o protocolo de número 037/15.

3.2. Formulações sólidas de praziquantel

Os fármacos praziquantel (PZQ)/ puro, copolímero P-188, copolímero P-407, copolímero PVA, praziquantel incorporado à nanopartícula (PZQ + P-188; PZQ + P-407; PZQ + PVA) nas concentrações de 50 mg/kg foram gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Cláudio Salomon da Universidade Nacional de Rosário/Argentina.

3.3. Infecção dos camundongos

Os camundongos fêmeas BALB/c de 8 a 12 semanas de idade foram inoculados via intra-peritoneal (IP) com 15 cisticercos de *T. crassiceps* (cepa ORF) adaptado de Vaz et al., (1997), em estágio inicial utilizando-se agulhas de 1mL. O grupo controle e os grupos experimentais foram compostos por 5 camundongos que foram infectados via IP com cisticercos de *T. crassiceps*. Os animais foram sacrificados com 30 dias de infecção e os cisticercos retirados de cavidade IP foram processados para as análises bioquímicas.

3.4. Diluição

Para diluição das formulações sólidas, foi considerado a dosagem de 50 mg; a dosagem de 0,05 g obtida a partir de cálculos utilizando regra de três foi utilizada. Essa quantidade de cada formulação sólida foi transferida para tubos falcon de 50 mL. Foi acrescentado no mesmo tubo

falcon 0,001 g de carboximetil celulose; as substâncias foram diluídas em 2,5 mL de solução fisiológica 0,9%.

3.5. Tratamento dos camundongos

Os camundongos com 30 dias de infecção (Figura 5) foram tratados por via oral com dose única das soluções de formulações sólidas diluídas. Foi construída uma tabela contendo: o peso de cada camundongo, dosagem das nanopartículas (50 mg) e a referência da diluição (100 mg em 5000 µL do volume administrado em µL). Cada camundongo foi pesado e o volume correspondente ao peso foi administrado por gavagem via oral. Os animais foram eutanasiados 24 hs após receber o tratamento. Antes de serem eutanasiados os camundongos foram pesados novamente.

Foram utilizados cinco camundongos para cada grupo, que foram 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.

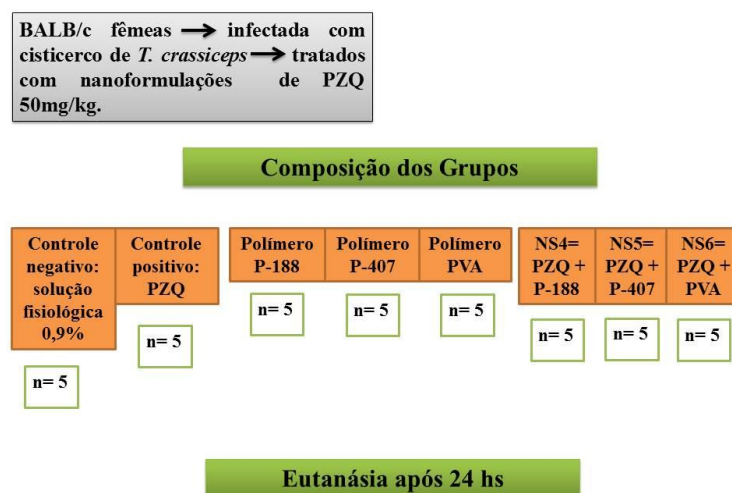


Figura 7- Representação esquemática dos grupos experimentais tratados com nanoformulações de PZQ, após 30 dias de infecção com cisticerco de *Taenia crassiceps*.

3.6. Análise bioquímica dos cisticercos

Os cisticercos retirados dos camundongos peritônio foram lisados em nitrogênio líquido, homogeneizados com tampão Tris-HCl a 0,1 M, pH 7,6-7,8. Das amostras resultantes foram extraídos os ácidos orgânicos por meio de uma coluna de troca iônica, o Bond Elut[®] (coluna Varian), como descrito por Bezerra et al., (1999) e Vinaud et al., (2007, 2008). Posteriormente, as amostras foram submetidas à análise de cromatografia líquida alta eficiência (CLAE – VarianProStar) com uma coluna de exclusão BIORAD-Aminex íon exclusion HPX – 87H (300 X 7,8 MM).

Os ácidos orgânicos foram identificados de acordo com o tempo de retenção e com calibração previamente realizada no CLAE utilizando padrões para piruvato e lactato, indicadores da glicólise; oxaloacetato, citrato, α -cetogluturato, succinato, fumarato e malato indicadores do ciclo do ácido tricarboxílico; acetato, acetoacetato, β -hidroxibutirato, e propionato, relacionados ao catabolismo de ácidos graxos (BEZERRA et al., 1999; VINAUD et al., 2007). Após a leitura dos ácidos na CLAE, foi obtido a concentração dos ácidos orgânicos em nmol/mL.

3.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa Sigma Stat 2.3. A estatística descritiva foi utilizada para determinar a média e desvio padrão, e para avaliar as diferenças entre os grupos, os resultados foram submetidos a análise de variância, ANOVA de uma via, seguido do test pos-hoc Holm-Sidak.

Para análise das diferenças dos pesos pré e pós-tratamento foi utilizada a ANOVA de medidas repetidas. O nível de significância adotado, em todos os experimentos, foi de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

Este estudo analisou o efeito das nanoformulações de praziquantel (NS4, NS5 e NS6) e dos polímeros P-188, P-407 e PVA no metabolismo energético de cisticercos de *Taenia crassiceps*, retirados da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c fêmeas.

Os resultados deste estudo revelaram que o praziquantel associado aos polímeros P-188, P-407, e PVA influenciaram de forma expressiva no metabolismo dos cisticercos de *Taenia crassiceps* (Tabelas 1 e 2).

4.1. Glicólise

Em relação ao processo de glicólise, analisamos a produção de glicose, piruvato e lactato nos cisticercos tratados com as nanoformulações. A concentração de glicose aumentou nos grupos tratados com PVA, P-188 e NS5 ($p < 0,05$), comparado aos demais grupos.

Nos grupos tratados com NS4 e NS5 foi possível observar que a produção de piruvato pelos cisticercos aumentou de forma significativa comparado aos outros grupos ($p < 0,05$). Em relação à produção de lactato, os resultados não apresentaram diferenças significativas ($p > 0,05$), exceto, no tratamento com o PVA e NS6.

Tabela 1- Ácidos orgânicos da glicólise e glicose produzidos por cisticercos de *Taenia crassiceps in vivo* expostos a nanoformulações de praziquantel.

	Controle	PZQ	PVA	P-188	P-407	NS4	NS5	NS6
Glicose (mg/dL)	17.6 ± 4.72	25.75 ± 15.45	47.66 ±* 4.02	115 ± 42,57*	85 ± 7.25	19 ± 4	127.66 ± 22.5*	33.4 ± 14.77
Piruvato (µM)	1.20 ± 0.77	61.29 ± 23.52	31.73 ± 29,89	29.847 ± 14446	15.84 ± 9.75	101.82 ± 24.42*	132.01 ± 24.48*	ND
Lactato (µM)	1164.21 ± 262.89	1265.6 ± 607.07	6525,72 ± 1635,39*	3140.44 ± 1963.36	2488.91 ± 919.85	1234.06 ± 397.52	2571.40 ± 429.47	2664.92 ± 1820.66*

ND= não detectado; negrito e * = diferença significativa $p < 0.05$ (ANOVA).

4.2. Ciclo do Ácido Tricarboxílico (ATC)

Os cisticercos retirados dos camundongos que compuseram o grupo controle negativo, que não receberam tratamentos, apresentaram o ciclo do ATC completo, comprovado pela presença do ácido orgânico α -cetoglutarato.

Tabela 2- Ácidos orgânicos do ciclo do ácido tricarboxílico (μ M) produzidos por cisticercos de *Taenia crassiceps* in vivo expostos a nanoformulações de praziquantel.

	Controle	PZQ	PVA	P-188	P-407	NS4	NS5	NS6
Citrato	251.38± 45.1	646.87± 87.53*	1867.25± 684.00*	1514.49± 388.31*	527.38± 367.21*	ND	ND	278.76± 125.76*
α-Kg	24.42± 16.67	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
OAA	7.09± 2.15	65.92± 33.32	243.61± 53.52*	149.25± 75.52*	49.69± 71.79	74.66± 24.53	228.95± 55.05*	8.18± 4.56
Malato	698.67± 161.51	ND	1643.50± 430,89*	1984.55± 368.94*	1153.17± 826.48*	ND	ND	601.76± 242.96*
Fumarato	136.48± 11.65	155.67± 47.09	293.54± 37.09	394.03± 120.87*	266.25± 164.18	186.99± 42.67	233.90± 13.93	101.41± 83.76*
Succinato	453.91± 148.10	1109.76± 644.63	ND	5135.55± 1960.40*	2455.47± 1094.24*	1211.15± 284.83*	3938.02± 815.99*	ND

α -kg= α -cetoglutarato; OAA= oxaloacetato; ND= não detectado; negrito e * = diferença significativa $p < 0.05$ (ANOVA).

Os ácidos orgânicos citrato e malato não foram detectados nos grupos tratados com NS4 e NS5. No entanto, nos grupos tratados com os polímeros PVA, P-188 e P-407, foi observado aumento na produção desses ácidos.

Foi observado aumento na produção de oxaloacetato em todos os grupos tratados comparados ao controle negativo, mas esse aumento foi mais expressivo em NS5.

Foi observado aumento na produção de succinato nos grupos tratados com NS4 e NS5, assim como, nos polímeros P-188 e P-407 comparados ao controle negativo e positivo. Nos tratamentos com NS6 e PVA este ácido não foi detectado. Notou-se um ainda, que a produção de

malato não foi detectada em NS4 e NS5, enquanto, a produção de fumarato se mostrou discreta, comparado a produção de succinato.

4.3. Produção de Corpos Cetônicos e Ciclo da Ureia

A Tabela 3 apresenta os resultados referentes à produção de corpos cetônicos, ureia e creatinina por cisticercos de *T. crassiceps*.

Tabela 3- Corpos cetônicos (μM), ureia (mg/dL) e creatinina (mg/dL) produzidos por cisticercos de *Taenia crassiceps* *in vivo* expostos a nanoformulações de praziquantel.

	Controle	PZQ	PVA	P-188	P-407	NS4	NS5	NS6
Acetato	333.810± 147.062	ND	1855.02± 574.11*	1547.978± 387.405*	ND	ND	ND	ND
AcAc	108.944± 23.723	330.570± 185.836	ND	ND	360.945± 169.573	336.182± 159.046	628.031± 51.995*	ND
BHB	2707.371± 1256.83°	1537.078± 594.231	4164.46± 2887.11*	10521.196± 2623.88*	6400.530± 1610.638*	1160.358± 1417.105*	5702.844± 1308.74*	1893.551± 240.615*
Fumarato	136.48± 11.65	155.67± 47.09	293.54± 37.09*	394.03± 120.87*	266.25± 164.18	186.99± 42.67	233.90± 13.93	101.41± 83.76*
Ureia	11± 1	14.5± 7.9	22.00± 1.00*	28.3± 6.6*	30.5± 0.6*	10.6± 2.5	34.6± 1.5*	19± 8.8
Creatinina	0.2± 0.001	0.22± 0.09	0.20± 0.00	0.16± 0.05	0.2± 0.001	0.13± 0.05	0.13± 0.05	0.14± 0.05

AcAc = Acetoacetato; BHB = β -Hidroxi butirato; ND = não detectado; negrito e * = diferença significativa $p < 0.05$ (ANOVA).

A produção de acetato aumentou significativamente nos grupos tratados com os polímeros PVA e P-188 comparado ao controle negativo ($p < 0,05$). Este ácido não foi detectado nos demais grupos.

Foi observado aumento na produção de acetoacetato no grupo tratado com NS5 em relação ao controle negativo e positivo, bem como, em relação ao P-407.

Quanto à produção de β -hidroxi butirato notou-se aumento no grupo tratado com NS5 comparado aos controles. Nos grupos tratados com NS4 houve diminuição na produção de β -hidroxi butirato em relação aos controles e polímeros.

A produção de ureia aumentou nos grupos tratados com NS5 e nos polímeros P-188, P-407 e PVA comparado aos controles.

Em relação a produção de creatinina as análises mostraram que não houve diferenças significativas entre os grupos ($p>0,05$).

4.4. Peso dos camundongos pré e pós-tratamento

As análises revelaram que o peso dos animais não apresentou diferenças significativas $p>0,05$ em nenhum grupo, após 24 horas de tratamento (Tabela 4).

Tabela 4- Peso pré e pós-tratamento com as nanoformulações de PZQ, dos camundongos Balb/c fêmeas, infectadas com cisticercos de *Taenia crassiceps*.

	Controle	PZQ	PVA	P-188	P-407	NS4	NS5	NS6
Pré- tratamento	24,05 ± 2,11	24,28 ± 0,85	26,90 ± 1,60	29,18± 5,45	29,08± 5,23	23,85 ± 1,95	30,60 ± 6,80	24,43 ± 2,83
Pós- tratamento	23,78 ± 2,24	24,53 ± 1,14	27,15 ± 1,13	27,85± 4,25	29,18± 5,45	24,13 ± 2,10	31,33 ± 7,03	24,85 ± 2,87

Diferença significativa= $p<0.05$ (ANOVA).

5. DISCUSSÃO

No presente estudo a concentração de glicose aumentou de forma expressiva no grupo tratado com NS5, comparado ao grupo tratado com PZQ convencional. O aumento na concentração de glicose em cisticercos de *T. crassiceps* tratados com PZQ foi previamente descrito por Fraga et al. (2012a). Porém o tratamento de cisticercos de *T. crassiceps in vitro* com PZQ nas concentrações 0.03 l $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0.06 l $\mu\text{g mL}^{-1}$ não influenciaram na concentração de glicose (VINAUD et al., 2008).

O polímero e as técnicas de obtenção influenciam não só estruturalmente, mas também atuam sobre as propriedades físico-químicas das partículas, na eficiência de inclusão e a cinética de liberação do princípio ativo (TRIERWEILER, 2009). Dessa forma, o aumento nas concentrações de glicose, piruvato e lactato sugere que as nanoformulações utilizadas neste estudo, em especial NS5, induziu a glicólise em cisticercos de *T. crassiceps* quando comparado aos controles.

O uso de piruvato por cisticercos de *T. crassiceps* ocorre por duas vias metabólicas diferentes: a via mitocondrial, a qual utiliza piruvato no ciclo do ATC, e sob ação da enzima málica é convertido em malato; ou na via citosólica o piruvato é consumido pela enzima lactato desidrogenase, produzindo lactato que é excretado (CORBIN et al., 1998).

O tratamento de PZQ em nanopartículas de lipídios sólido em cães naturalmente infectados com *Echinococcus granulosus*, revelou que essa formulação é promissora na melhora e eficácia terapêutica de PZQ (XIE et al., 2011).

A concentração de oxaloacetato aumentou nos grupos tratados com NS4 e NS5, Vinauld et al. (2008), sugeriu que o aumento desse ácido ocorre provavelmente pela ação da enzima fosfenolpiruvato carboxi-cinase ou a malato desidrogenase citosólica ou mitocondrial que produz oxaloacetato. Ainda no estudo destes autores, o citrato não apresentou diferenças significativas comparado ao controle. Os resultados deste estudo revelou aumento de citrato nos grupos tratados com a nanoformulação NS6, o que sugere a ação da enzima citrato sintase na produção e aumento desse ácido orgânico.

A inversão parcial do ciclo do ATC foi observado neste estudo, pela ausência ou redução na produção dos ácidos orgânicos citrato e α -cetoglutarato nos grupos tratados com NS4 e NS5. Esse mecanismo é também conhecido como via da fumarato redutase, a qual conduz a produção

de succinato mitocondrial através da conversão de piruvato em malato que é convertido em fumarato que resulta em succinato o qual pode ser usado pela cadeia transportadora de elétrons ou ser excretado como descrito previamente em cisticercos de *T. crassiceps* por Leandro et al. (2014).

A não detecção de acetato nos grupos tratados com PZQ, P-407 e nos grupos tratados com as nanoformulações, sugere o uso de Acetil-CoA para a produção de acetoacetato que foi convertido em β -hidroxibutirato. Trata-se de uma via alternativa na produção de energia, essa via pode ser ativada devido a comprometimento na captação de glicose ou por danos no tegumento, observado quando o parasito é exposto ao PZQ (CIOLI et al., 1995; CIOLI; PICA-MATTOCCIA, 2003).

A ativação do ciclo da ureia foi sugerido neste estudo, a partir do aumento dessa substância observado nos grupos tratados com NS4 e polímeros P-188 e P-407. A influência do tratamento com PZQ no ciclo da ureia foi descrito em cisticercos de *T. crassiceps in vivo* e *in vitro* por Vinaud et al. (2009) e Fraga et al. (2012a).

Estudos com PZQ nanoencapsulado tem sido realizado com outros helmintos. Os testes *in vivo* com o *Schistosoma mansoni*, na fase adulto, não apresentou potencial citotóxico nem genotóxico (FONSECA et al., 2013).

Os autores supracitados concluíram que as nanopartículas do PZQ desenvolvidas apresentam grande potencial para resolver as principais deficiências associadas ao produto disponível atualmente no mercado para o tratamento da esquistossomose, uma vez que permite modular a liberação do fármaco com maior taxa de absorção pelo organismo, possibilitando o mascaramento do sabor desagradável do medicamento. Essas são etapas muito importantes para aumentar a eficiência do tratamento junto às crianças.

Dados recentes da literatura reforçam que estamos perto de encontrar o alvo ou via metabólica de ação do PZQ, em tratamentos contra helmintos. O conhecimento do mecanismo de ação desse fármaco é extremamente importante na busca de novos compostos que possam complementá-lo, seja através de vias independentes ou resolvendo a limitação da sua eficácia sobre a forma larval do parasito.

6. CONCLUSÃO

As nanoformulações do PZQ promoveu a glicólise, fornecendo substrato para o ciclo do ATC com inversão parcial deste.

O aumento na concentração de succinato sugeriu a excreção desse ácido orgânico por cisticercos de *T. crassiceps*.

O uso de uma via alternativa na produção de energia foi observado pelo aumento da concentração de β -hidroxibutirato, bem como, ativação do ciclo da ureia.

Os tratamentos com nanoformulações não influenciaram no peso dos animais.

As nanoformulações de praziquantel alteraram o metabolismo dos cisticercos de *T. crassiceps*, sendo que as nanoformulações NS4 e NS5 produziram maiores efeitos no metabolismo desse parasito.

7. REFERÊNCIAS

- AGAPEJEV, S. Aspectos clínico-epidemiológicos da neurocisticercose no Brasil. **Arquivos de Neuro-psiquiatria**, v. 61, n.3B, p. 822-828. 2003.
- ALARCON, F. Neurocysticercosis: its aetiopathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Revista de Neurologia**, v.10, n.43, p.93-100, 2006.
- ALMEIDA, C. R. **Aplicação de genética molecular para diagnóstico de neurocisticercose e descoberta gênica em *Taenia solium***. 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós- Graduação em Ciências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.
- ANGELUCCI, F.; BASSO, A.; BELLELLI, A.; BRUNORI, M.; PICA MATTOCCIA L.; VALLE, C. The anti-schistosomal drug praziquantel is an adenosine antagonist. **Parasitology Research**, v.134, p. 1215-21, 2007.
- ARENAL, P.; RUBIO, M.E.; RAMIREZ, J.; RENDÓN, J.L.; ESCAMILLA, J.E. Cyanide-resistant respiration in *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) is explained by H₂O₂-producing side-reaction of respiratory complex I with O₂. **Parasitology International**, v.54, p.185–193, 2005.
- BEZERRA, J.C.B.; KEMPER, A.; BECKER, W. Profile of organic acid concentrations in the digestive gland and hemolymph of *Biomphalaria glabrata* under estivation. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 6, p.779-784, 1999.
- BOOTH, N.; DONALD, L. E.; Farmacologia e terapêutica em veterinária. **Editora Guanabara Koogan**, Cap. 13, ed. 6, p.168-218, Rio de Janeiro, 1992.
- BRUNETTI, E.; KERN, P.; VUITTON, D.A. Expert consensus for the diagnosis and treatment of cystic and alveolar echinococcosis in humans. **Acta Tropica**, v.114, p.1–16, 2010.
- CAMPOS, F.S. **Desenvolvimento de blendas de dextranos de pesos moleculares 70 e 148 kDa para a obtenção de hidrogéis contendo praziquantel**. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)- Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2013.
- CASTINEIRAS, T.M.P.P.; MARTINS, F.S.V. Infecções por helmintos e enteroprotzoários. **CIVES**. Rio de Janeiro, 2003.
- 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.
- CIOLI, D., PICA-MATTOCCIA, L., ARCHER, S. Antischistosomal drugs: past, present and future? **Pharmacology & therapeutics**, v. 68, n.1, p. 35-85,1995.

CIOLI, D.; PICA-MATTOCCIA, L. Praziquantel. **Parasitology Research**, v. 90, p. 83–89, 2003.
 CIRRI, M. ; MURA, P. ; RABASCO, A.M. ; GINES, J.M. ; MOYANO, J.R. ; GONZALEZ, R.M.L. Characterization of ibuprofan binary and ternary dispersion with hydrophylic carries. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 30, n. 1, p. 65-74, 2004.

CORBIN, I.; SIMCOV, R.; NOVAK, M.; BLACKBURN, B.J. Metabolism of [3-13C]-pyruvate by cysticerci of *Taenia crassiceps*. **Parasitology Research**, v.84, p.516–518, 1998.

DAMASCENO, B.P.G.L.; SILVA, J.A.; OLIVEIRA, E.E.; SILVEIRA, W.L.L.; ARAÚJO, I.B.; OLIVEIRA, A.G.; EGITO, E.S.T. Microemulsão: um promissor carreador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. João Pessoa, v.32, n.1, p. 9-18, 2011.

DOENHOFF, M.J.; CIOLI, D.; UTZINGER, J. Praziquantel: mechanisms of action, resistance and new derivatives for schistosomiasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, p. 659-667, 2008.

ESPÍNDOLA, N. M; VAZ, A. J.; PARDINI, A. X.; FERNANDES, I. Excretory/secretory antigens (ES) from in-vitro cultures of *Taenia crassiceps* cysticerci, and use of an anti-ES monoclonal antibody for antigen detection in samples of cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis. **Annals Tropical Medicine and Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 361–368, 2002.

FLISSER, A. Cisticercosis: un problema de salud pública y de producción ganadera. **Revista Salud Uninorte**. Barranquilla, v.3, n.1, p.43-48, 1986.

FONSECA, L. B. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas contendo praziquantel para o tratamento da esquistossomose**. 2012. Tese (Doutorado em Engenharia Química) - Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

FONSECA, L.B.; VIÇOSA, A.L.; MATTOS, A.C.A.; COELHO, P.M.Z.; NEUSA ARAÚJO, N.; ZAMITH, H.P.S.; VOLPATO, N.M.; PINTO, J.C.C.S. Desenvolvimento de um medicamento brasileiro nanoencapsulado para o tratamento da esquistossomose. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 1, n. 4, p. 85-91, 2013.

FRAGA, C. M.; COSTA, T. L.; BEZERRA, J. C. B.; LINO JR, R. S.; VINAUD, M. C. Fatty acids oxidation and alternative energy sources detected in *Taenia crassiceps* cysticerci after host treatment with antihelminthic drugs. **Experimental Parasitology**, v.131, p.111–115, 2012a.

FRAGA, C. M.; COSTA, T. L.; BEZERRA, J. C. B.; LINO JR, R. S.; VINAUD, M. C. *Taenia crassiceps*: Host treatment alters glycolysis and tricarboxylic acid cycle in cysticerci. **Experimental Parasitology**, v.130, p.146–151, 2012b.

FREEMAN, R.S. Studies on the biology of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800) Rudolphi, 1810 (Cestoda). **Canadian Journal of Zoology**, v.40, p.969-990, 1962.

FRÉZARD, F.; SCHETTINI, D. A.; ROCHA, O. G. F.; DEMICHELI, C. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Revista Química Nova**. Belo Horizonte, v. 28, n. 3, p.511-518, 2005.

GARCIA, H.H.; DEL BRUTTO, O.H. Neurocysticercosis: updated concepts about an old disease. **The Lancet Neurology**, v.4, p.653–661, 2005.

GROLL, E.E. Chemotherapy of human cysticercosis with praziquantel. IN: FLISSER, A.; WILLMS, K.; LACLETTE, J.P.; LARRALDE, C. Cysticercosis: present state of knowledge and perspectives. **Academic Press**. New York, USA. p.700, 1982.

HELDWEIN, K.; BIEDERMANN, H.; HAMPERL, W.; BRETZEL, G.; LOSCHER, T.; LAREGINA, D.; FROSCH, M.; BUTTNER, D.W.; TAPPE, D. Subcutaneous *Taenia crassiceps* infection in a patient with Non-hodgkin's lymphoma. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. Hamburg, Germany, v. 75, n. 1, p. 108-111, 2006.

KÖHLER, P. The strategies of energy conservation in helminthes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.17, p. 1-18, 1985.

KÖHLER, P.; VOIGT, W.P. Nutrition and Metabolism. Parasitology in focus: facts and trends. **Springer-Verlag**. 1ª ed. p.924. Berlim, 1988.

KREUTER, J. Nanoparticles - a historical perspective. **International Journal o Pharmaceutics**, 2006.

LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A.; MAILANDER, V. From polymeric particles to multifunctional nanocapsules for biomedical applications using the miniemulsion process. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 48, p. 493-515, 2010.

LEANDRO, L. A.; FRAGA, C. M.; LINO JR, 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, p.1313–1317, 2014.

LEOPOLD, G.; UNGETHÜM, W.; GROLL, E.; DIEKMANN, H.W.; NOWAK, H.; WEGNER, D.H.G.; Clinical pharmacology in normal volunteers of praziquantel, a new drug against schistosomes and cestodes – an example of complex study covering both tolerance and pharmacokinetics. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.14, p.281–291, 1978.

LIMA, A.C. **Preparação de dispersões sólidas de praziquantel com polivinilpirrolidona pelo processo do fluido supercrítico**. 2009. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

LINDENBERG, M.; KOPP, S.; DRESSMAN, J. B. Classification of orally administered drugs on the World Health Orgnization list of essencial medicines according to the biopharmaceutics

classification system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 58, p. 265-278, 2004.

MAHANTY, S.; MADRID, E. M.; NASH, T. E. Quantitative Screening for Anticestode Drugs Based on Changes in Baseline Enzyme Secretion by *Taenia crassiceps*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 2, p. 990–995, 2013.

MAILLARD, H.; MARIONNEAU, J.; PROPHETTE, B.; BOYER, E.; CELERIER, P. *Taenia crassiceps* cysticerci and AIDS. **AIDS**, v.12, p.1551-1552, 1998.

MAQUETA-AFARAY, J.; CAPAQUIRA, E.; CONDE, L. Cisticercosis diseminada: reporte de un caso en Perú. **Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica**, v.31, n.2, p.370-374, 2014.

MERCHANT, M.T.; AGUILAR, L.; AVILA, G.; ROBERT, L.; FLISSER, A.; WILLMS, K. *Taenia solium*: description of the intestinal implantation sites in experimental hamster infections. **Journal of Parasitology**, v.84, p. 681–685, 1998.

NASH, T.E.; GARCIA, H.H. Diagnosis and Treatment of Neurocysticercosis. **Nature Reviews Neurology**, v.7, n. 10, p. 584–594, 2011.

NGWULUKA, N. Application of in situ polymerization for desing and development of oral drug delivery systems. **AAPS PharmSciTech**, v.11, n.4, 2010.

NOGALES-GAETE, J.; ARRIAGADA, C.R.; SALINAS, R. R. Tratamiento de La neurocisticercosis: revisión crítica. **Revista Médica do Chile**, v. 134, p. 789-796, 2006.

NOVAES, M.R.C.G.; SOUZA, J.P.; ARAÚJO, H.C. Síntese do anti-hemíntico praziquantel, a partir da glicina. **Revista Química Nova**. Brasília, v.22, n.1, 1999.

NTOUKAS, V.; TAPPE, D.; PFÜTZE, D.; SIMON, M.; HOLZMANN, T. Cerebellar Cysticercosis Caused by Larval *Taenia crassiceps* Tapeworm in Immunocompetent Woman, Germany. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 12, December, 2013.

PADILLA, A.; GOVEZENSKY, T.; SCLUTTO, E.; JIMENEZ-GARCIA, L.F.; GONSENBATT, M.E.; RAMIREZ, P.; LARRALDE, C. Kinetics and characterization of cellular responses in the peritoneal cavity of mice infected with *Taenia crassiceps*. **The Journal of Parasitology**, v.87, n.3, p.591-599, 2001.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. Fármacos Antihelmínticos. **Editora Guanabara Koogan**, edição 4, p. 624, 2000.

REICH, M. R.; GOVINDARAJ, R. Dilemmas in drug development for tropical diseases. Experience with praziquantel. **Health Policy**, v. 44, p. 1-18, 1998.

ROPPA, L. Perspectivas da produção mundial de carnes, 2006 a 2030. **Revista Pork World**, n.34, p.16-27, 2006.

SANCHEZ, J.; FALCARE, R.S.; LOPES, P.S. Sistemas de liberação controlada. **Pharmacia Brasileira**. São Paulo, p.22, nov/dez, 2006.

SWEETMAN, S. C. Martindale: the complete drug reference. **Pharmaceutical Press**. Londres, v. 33, 2002.

THOMAS, H.; GONNERT, R. The efficacy of praziquantel against cestodes in animals. **Z Parasitenkd**, v. 52, p.117–127, 1977.

TRIERWEILER, L. F. **Nanopartículas: Como Produzilas em Escala Industrial**. 2009. 178 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química)- Programa de Pós-graduação em Engenharia Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

VAZ, A. J.; NUMES, C. M.; PIAZZA, R. M.; LIVRAMENTO, J. A.; DA SILVA M. V.; NAKAMURA, P. M. Immunoblot with cerebrospinal fluid from patients with neurocysticercosis using antigen from cysticerci of *Taenia solium* and *Taenia crassiceps*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 57, p. 354-357, 1997.

VINAUD, M. C.; FERREIRA, C. S.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. *Taenia crassiceps*: Energetic and respiratory metabolism from cysticerci exposed to praziquantel and albendazole *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 120, p. 221-226, 2008.

VINAUD, M. C.; FERREIRA, C. S.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. B. *Taenia crassiceps*: Fatty acids oxidation and alternative energy source in *in vitro* cysticerci exposed to anthelmintic drugs. **Experimental Parasitology**, v. 122, p. 208–211, 2009.

VINAUD, M. C.; LINO JUNIOR, R. S.; BEZERRA, J. C. *Taenia crassiceps* organic acids detect in cysticerci. **Experimental Parasitology**, v. 116, p. 335-339, 2007.

VINAUD, M.C. **Vias do metabolismo energético e respiratório em cisticercos de *Taenia crassiceps in vivo* e seu estudo *in vitro* sob a ação de fármacos anti-helmínticos**. 2007. Tese (Doutorado em Medicina Tropical e Saúde Pública) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2007.

WHO, 2010 – Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: First WHO report on neglected tropical diseases. **World Health Organization**. ISBN 978 9241564090, 184pp.

WILLMS, K.; JIMÉNEZ, J. A.; EVERHART, M.; KUHN, R. E. Ultrastructure of spermiogenesis and the spermatozoon in *Taenia crassiceps strobilae* WFU strain (Cestoda, Cyclophyllidea, Taeniidae) from golden hamsters. **Parasitology Research**, v.93, p.262–267, 2004.

- WILLMS, K.; ZURABIAN, R. *Taenia crassiceps*: in vivo and in vitro models. **Parasitology**, v. 137, p. 335–346, 2010.
- WUNSCHMANN, A.; GARLIE, V.; AVERBECK G.; KURTZ, H.; HOBERG, E. P. Cerebral cysticercosis by *Taenia crassiceps* in a domestic cat. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 15, p. 484–488, 2003.
- XIE, S; PAN, B; SHI, B; ZHANG, Z; ZHANG, X; WANG, M; ZHOU, W. Solid lipid nanoparticle suspension enhanced the therapeutic efficacy of praziquantel against tapeworm. **International Journal of Nanomedicine**, v.6, p. 2367-2374, 2011.
- ZENKA, J.; PROKOPIC, J. Malic enzyme, malate dehydrogenase, fumarate reductase and succinate dehydrogenase in the larvae of *Taenia crassiceps* (Zeder 1800). **Folia Parasitologica**, v.34, p.131–136, 1987.
- ZURABIAN, R.; AGUILAR, L.; JIMÉNEZ, J. A.; ROBERT, L.; WILLMS K. Evagination and infectivity of *Taenia crassiceps* cysticerci in experimental animals. **Journal of Parasitology**, v. 94, p. 1–6, 2008.