

Atividade antiparasitária do artemether na esquistossomose mansônica experimental

Antischistosomal activity of artemether in experimental Schistosomiasis mansoni

Susana Zevallos Lescano^a, Pedro Paulo Chieffi^{a,b}, Rosa Regina Canhassi^a, Marcos Boulos^c e Vicente Amato Neto^d

^aLaboratório de Imunopatologia da Esquistossomose (LIM 06) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil. ^bFaculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil. ^cDepartamento de Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil. ^dLaboratório de Parasitologia (LIM 46) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo, SP, Brasil

Descritores

Schistosoma mansoni. Artemisininas, uso terapêutico. Esquistossomose mansoni, quimioterapia. Experimentação animal. Artemether.

Resumo

Objetivo

Avaliar o efeito da administração intramuscular de artemether a camundongos infectados experimentalmente por *Schistosoma mansoni* no momento da infecção, durante a maturação dos esquistossômulos e após iniciada a oviposição.

Métodos

Oitenta camundongos Balb/c, fêmeas adultas, foram divididos em oito grupos com 10 animais cada. Sete grupos foram infectados por *S. mansoni* empregando-se 60 cercárias para cada animal, inoculadas por via subcutânea; o grupo restante foi mantido sem infecção. Entre os sete grupos infectados, seis foram tratados com artemether, segundo o seguinte esquema: três grupos receberam dose correspondente a 100 mg/kg no dia 0, 20 ou 60 após inoculação das cercárias; os demais receberam 50 mg/kg de artemether, no mesmo período que os lotes anteriores. Da 9^a, 10^a e 11^a semanas após infecção os camundongos infectados por *S. mansoni* foram submetidos a exames de fezes pela técnica de Kato-Katz. No 80^o dia do experimento, os animais sobreviventes foram sacrificados e submetidos à perfusão do sistema porta para recuperação de vermes. Determinaram-se, nessa ocasião, os pesos corporal, hepático e esplênico de cada animal.

Resultados

Observou-se queda na oviposição e no número de vermes recuperados entre os camundongos tratados com artemether (50 ou 100 mg/kg) no 20^o dia após infecção. A diminuição do número de vermes foi mais expressiva no caso de fêmeas de *S. mansoni*. Verificou-se, ainda, diminuição significativa nos pesos hepático e esplênico entre os animais tratados com 50 e 100 mg/kg de artemether no 20^o dia e também entre os que receberam a droga na dose de 50 mg/kg 60 dias após infecção.

Conclusões

Ficou evidenciada a atividade anti-*Schistosoma* do artemether, mesmo ao se empregar dose correspondente a 50 mg/kg, quando a droga foi administrada durante o período de maturação dos esquistossômulos no sistema porta do hospedeiro vertebrado.

Keywords

Schistosoma mansoni. Artemisinins, therapeutic use. Schistosomiasis mansoni, drug therapy. Animal

Abstract

Objective

To evaluate the effect of intramuscular injection of artemether in mice experimentally

Correspondência para/ Correspondence to:

Pedro Paulo Chieffi
Instituto de Medicina Tropical
Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar, 500 2^o andar
Cerqueira César
05403-000 São Paulo, SP, Brasil
E-mail: pchieffi@usp.br

Apresentado no 36^o Congresso Brasileiro de Patologia Clínica – Medicina Laboratorial realizado em São Paulo, 2002. Recebido em 1/11/2002. Reapresentado em 11/7/2003. Aprovado em 6/8/2003.

experimentation. Artemether:

infected with *Schistosoma mansoni*, at the time of infection, during schistosomula maturation and after the beginning of egg-laying.

Methods

Eighty adult females Balb/c mice were divided into 8 groups with 10 animals each. Seven groups were infected with *S. mansoni* using 60 cercariae for each animal, inoculated subcutaneously, and the remaining group was maintained without infection. Among the seven infected groups, six were treated with artemether, according to the following schedule: three groups received doses of 100 mg/kg on days 0, 20 or 60 after inoculation of the cercariae; the other three received 50 mg/kg of artemether, also on days 0, 20 or 60. At the end of the 9th, 10th and 11th weeks after infection all the mice infected with *S. mansoni* were submitted to fecal examination using the Kato-Katz technique. On the 80th day of the experiment, the surviving animals were sacrificed and submitted to perfusion of the portal system in order to recover the worms. Body, liver and spleen weights of each animal were determined at that time.

Results

A reduction in egg-laying and the number of worms recovered was observed in mice treated with artemether (50 or 100 mg/kg) on the 20th day after infection. The decrease in the number of worms was more notable among *S. mansoni* females. A significant decrease in liver and spleen weights was also seen on the 20th day among animals treated with 50 or 100 mg/kg of artemether and also among those that received the drug at a dose of 50 mg/kg 60 days after infection.

Conclusions

Evidence of the antischistosomal activity of artemether was shown, even at a dose of 50 mg/kg, when the drug was administered during the schistosomula maturation period in the portal system of the vertebrate host.

INTRODUÇÃO

Acredita-se que existam no Brasil no mínimo 2,5 milhões de portadores de esquistossomose mansoni e cerca de 25 milhões de indivíduos expostos aos riscos de contrai-la.⁹

Duas drogas têm sido amplamente usadas no tratamento da doença com boa eficácia e baixa toxicidade: oxamniquine e praziquantel, ocorrendo preferência pelo uso do segundo nos últimos anos. Em vista do possível desenvolvimento de tolerância ou resistência ao praziquantel, justifica-se a pesquisa e produção de novas drogas para prevenção e cura da esquistossomose mansoni.⁴

Os derivados da artemisinina, usados com eficácia no tratamento da malária, também revelaram atividade anti-*Schistosoma*, especialmente o artemether. A ação esquistossomicida da artemisinina foi descoberta em 1980 por cientistas chineses: a droga administrada a animais infectados experimentalmente com *Schistosoma japonicum* provocou marcada redução da carga de vermes quando comparada com a dos animais controle não tratados (Chen et al *apud* Utzinger et al,¹¹ 2001).

Em 1982, Le et al⁷ confirmaram a propriedade esquistossomicida do artemether: Camundongos ou cães infectados com *S. japonicum* e tratados com esta

droga em doses variadas e utilizando diferentes vias de administração mostraram redução significativa na carga de vermes. As fases larvárias (esquistossômulos) de *S. japonicum* mostraram-se também suscetíveis ao artemether. Porém, não foi observado nenhum efeito sobre os ovos do trematódeo.¹⁵ Estudos subsequentes confirmaram as propriedades esquistossomicidas para outros derivados da artemisinina: artesunato,^{3,8} arteether¹⁴ e, recentemente, para a dihidroartemisinina.¹ Em 1991, Araújo et al,² no Brasil, estudaram a atividade do artemether em hamsters e camundongos infectados experimentalmente por *S. mansoni* 45 dias após a penetração das cercárias. Observaram, ainda, melhores resultados quando a droga foi administrada por via intramuscular.

No presente trabalho procurou-se avaliar o efeito da administração intramuscular de artemether em camundongos experimentalmente infectados com *S. mansoni* no momento da infecção, durante a maturação dos esquistossômulos e após o início da oviposição.

MÉTODOS

Foram utilizados 80 camundongos da linhagem Balb/c, fêmeas adultas, divididos em oito subgrupos: seis infectados por *S. mansoni* e tratados com artemether, um igualmente infectado porém não tratado com artemether e, por fim, outro

Tabela 1 - Esquema de tratamento com artemether, por via intramuscular, nos camundongos infectados com *S. mansoni*.

Subgrupo camundongos	N	Dose	Dia de tratamento
1	10	100 mg/kg de peso	zero
2	10	100 mg/kg de peso	20 p.i.
3	10	100 mg/kg de peso	60 p.i.
4	10	50 mg/kg de peso	zero
5	10	50 mg/kg de peso	20 p.i.
6	10	50 mg/kg de peso	60 p.i.
7	10	Controle infectado	Não tratado
8	10	Livres de infecção	Não tratado

p.i.= pós-infecção

subgrupo não infectado nem tratado, conforme mostra a Tabela 1.

Os camundongos dos subgrupos 1 a 7 foram infectados cada um com 60 cercárias de *S. mansoni*, cepa BH, por via subcutânea. A cepa BH do trematódeo vem sendo mantida, há mais de 15 anos, no Laboratório de Imunopatologia da Esquistossomose do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo utilizando-se exemplares de *Biomphalaria glabrata* e hamsters. O inóculo correspondente a 60 cercárias foi obtido por diluição (1:6) de alíquota que continha 1.800 cercárias por mL, injetando-se 0,2 mL em cada camundongo. O artemether, nas doses correspondentes a 50 e 100 mg/kg, foi administrado por via intramuscular aos camundongos dos subgrupos 1 a 6.

Avaliou-se o efeito do artemether por meio de exames de fezes quantitativos efetuados segundo o método de Kato-Katz⁶ na 9^a, 10^a e 11^a semanas após a infecção. Oitenta dias após o início do experimento os animais sobreviventes foram sacrificados e sub-

metidos à perfusão do sistema porta para recuperação e contagem dos vermes presentes, segundo técnica recomendada por Pellegrino & Siqueira.¹⁰ Nessa ocasião, determinaram-se os pesos corporal, hepático e esplênico de cada camundongo.

Durante todo o experimento os camundongos receberam alimentação e água *ad libitum* e o seu manejo obedeceu às recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal.

Os resultados foram analisados com o emprego de testes estatísticos não paramétricos, utilizando-se nível de significância de 95% (p=0,05).

RESULTADOS

Na Tabela 2 consta o número médio de ovos de *S. mansoni* por grama de fezes obtido nos diversos lotes de camundongos, durante a 9^a, 10^a e 11^a semanas após infecção. Nos subgrupos 2 e 5, tratados com artemether aos 20 dias p.i. com, respectivamente, doses de 100 mg/kg e 50 mg/kg, houve queda acentuada no número de ovos encontrado.

Na Tabela 3 apresentam-se os dados referentes ao número de vermes recuperados após perfusão do sistema porta dos animais sobreviventes.

A relação entre os pesos hepático e esplênico e o peso corporal dos camundongos dos diversos grupos estudados está apresentada na Tabela 4. Observou-se diferença significativa entre os valores encontrados nos animais dos subgrupos 2, 5 e 6 e os do lote de

Tabela 2 - Resultados do exame de fezes (Kato Katz) entre a 9^a e 11^a semanas após infecção por *S. mansoni* nos camundongos tratados ou não com artemether.

Subgrupo (dose artemether)	Camundongos examinados	9 ^a semana p.i.	Ovos/gr de fezes 10 ^a semana p.i.	11 ^a semana p.i.
1 (100 mg/kg, dia 0)	10	239,0	168	158,4
2 (100 mg/kg, 20 dpi)	10	19,2	0	0
3 (100 mg/kg, 60 dpi)	6	75,4	85,7	0
4 (50 mg/kg, dia 0)	9	163,0	125,3	112,0
5 (50 mg/kg, 20 dpi)	10	0	12,0	4,8
6 (50 mg/kg, 60 dpi)	10	103,2	138,0	7,2
7 (Sem tratamento)	8	269,3	243,0	147,0

p.i.= pós-infecção

Tabela 3 - Número médio de vermes recuperados nos camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados com diferentes doses de artemether.

Subgrupo	Camundongos perfundidos	Fêmeas N	Machos N	Vermes N
1	10	3,0 3,85	9,0 4,07	12,0 6,97
2	10	0,1 0,31*	1,3 1,83*	1,4 1,9*
3	6	0,0	8,5 6,53	8,5 6,53
4	9	0,75 0,88	6,87 9,34	7,62 9,78
5	10	0,2 0,42*	2,8 6,83	3,0 6,81
6	10	0,125 0,35*	1,75 2,71*	1,85 2,95*
7	8	1,67 2,34	6,0 8,03	7,67 10,16

*Diferença significativa.

Tabela 4 - Relação peso esplênico X 100/ peso corporal e peso hepático X 100/ peso corporal em camundongos infectados por *S. mansoni* e tratados com artemether.

Subgrupo	Camundongos examinados	Peso esplênico x 100/peso corp.	Peso hepático x 100/ peso corp.
1	10	1,137 0,44	6,817 1,68
2	10	0,675 0,09*	5,536 0,70*
3	6	1,078 0,24	6,732 0,56
4	9	1,262 0,80	7,426 2,31
5	10	0,704 0,22*	4,617 1,02*
6	10	0,705 0,18*	5,631 1,12*
7	8	1,46 0,60	8,021 1,85
8	10	0,402 0,09	4,443 0,80

*Diferença significativa

camundongos infectados porém não tratados com artemether (subgrupo 7).

DISCUSSÃO

A esquistossomose continua a ocupar – após a malária – a segunda posição no mundo entre as parasitoses, em termos de extensão de áreas endêmicas e quantidade de pessoas infectadas. O tratamento com praziquantel é eficaz na redução da morbidade, porém, falha na prevenção da reinfeção. Portanto, ainda existem focos com elevados índices de transmissão em áreas endêmicas, apesar da administração regular desta droga.¹³ Em vista do possível desenvolvimento de tolerância e/ou resistência a essa droga, justifica-se a pesquisa de novas alternativas para a prevenção e cura da esquistossomose.⁴

A artemisinina (qinghaosu) é o princípio ativo extraído das folhas de *Artemisia annua*, uma planta amplamente disseminada na China e que também cresce naturalmente na Europa Central, Estados Unidos e Argentina. Sua atividade antimalárica foi confirmada em 1971 e durante os últimos 20 anos, mais de dois milhões de pacientes com malária foram tratados com esta droga e seus derivados (artemether, artesunato e arteeter).¹¹ A atividade antiesquistossômica da artemisinina foi descoberta em 1980, quando se verificou que sua administração a animais experimentalmente infectados com *S. japonicum* provocou marcada redução na carga de vermes, comparada à de animais controle não tratados.¹¹ Tais resultados foram confirmados pelos achados de Le et al⁷ (1982) e, por sua vez, Yue et al¹⁵ (1984) verificaram suscetibilidade de esquistossômulos de *S. japonicum* ao artemether. Não observaram, porém, nenhum efeito dessa droga sobre os ovos do trematódeo.

Estudo experimental efetuado por pesquisadores chineses mostrou maior atividade do artemether contra *S. mansoni* quando a droga, empregada em dose elevada (400 mg/kg), foi utilizada na fase de evolução dos esquistossômulos (14 a 21 dias após penetra-

ção das cercárias), evidenciando-se menor atividade sobre vermes adultos. Pesquisa realizada no Brasil (Araújo et al,² 1991) confirmou a redução moderada da carga parasitária quando o artemether foi empregado em camundongos que albergavam exemplares adultos de *S. mansoni*.

No presente trabalho procurou-se utilizar doses menores de artemether, mais próximas das empregadas em seres humanos no tratamento da malária, com o objetivo de simular situação que poderá ocorrer em regiões onde malária e esquistossomose são endêmicas. Os resultados obtidos sugerem igualmente maior atividade do artemether sobre os esquistossômulos (Tabela 3). Nos animais dos subgrupos 2 e 5 (infectados e tratados com 100 mg/kg/peso e 50 mg/kg de peso de artemether aos 20 dias pi., ocasião em que se processa a maturação dos esquistossômulos), recuperou-se menor número de vermes após a perfusão do sistema porta. Esses resultados foram confirmados pela ausência ou baixa contagem de ovos nas fezes de camundongos dos mesmos subgrupos na 10^a e 11^a semanas após a infecção (Tabela 2). Tais achados coincidem, em parte, com os de Xiao & Catto¹² (1989) e Xiao et al¹³ (2000), que trabalharam com camundongos infectados com *S. mansoni* e observaram que os parasitos com 14 e 21 dias de idade foram os mais suscetíveis ao artemether. Nos subgrupos tratados com artemether, com exceção do subgrupo 3 que recebeu a droga quando já estavam plenamente desenvolvidos os exemplares de *S. mansoni*, observou-se menor mortalidade do que no subgrupo 7, constituído por camundongos infectados por *S. mansoni* e não tratados com artemether.

Os animais dos subgrupos 3 e 6 – tratados aos 60 dias pi. com 100 mg/kg e 50 mg/kg de peso de artemether – apresentaram menor número de vermes fêmeas após a perfusão (Tabela 3) e a contagem de ovos foi negativa na última semana do experimento (Tabela 2). Fica, assim, evidenciada atividade antiparasitária do artemether, principalmente sobre esquistossômulos e fêmeas de *S. mansoni*,

mesmo quando se utilizam doses menores dessa droga.

No Brasil, praticamente não existe superposição de áreas endêmicas de malária e esquistossomose. Entretanto, em certas regiões do continente africano, a transmissão dessas parasitoses ocorre concomi-

tantemente e os resultados com o uso de praziquantel têm sido menos promissores do que o esperado.⁵ Nessas circunstâncias, o emprego de derivados da artemisinina com o intuito de tratar casos de malária pode exercer influência não desprezível na diminuição da taxa de morbidade da endemia esquistossomótica.

REFERÊNCIAS

1. Abdel-Aziz SS, El-Badawy NM. Experimental trials of an artemisinin derivative in treatment of *Schistosoma mansoni* infected mice. *J Egypt Soc Parasitol* 2000;30:295-303.
2. Araujo N, Kohn A, Katz N. Activity of the Artemether in experimental Schistosomiasis mansoni. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1991;86 (Suppl 2):185-8.
3. Araujo N, Kohn A, Katz N. Avaliação terapêutica do artesunato na infecção experimental pelo *Schistosoma mansoni*. *Rev Soc Brasil Med Trop* 1999;32:7-12.
4. Cioli D. Praziquantel: is there real resistance and are there alternatives? *Curr Opin Infect Dis* 2000;13:659-63.
5. Danso-Appiah A, De Vlas SJ. Interpreting low praziquantel cure rates of *Schistosoma mansoni* infections in Senegal. *Trends Parasit* 2002;18:125-9.
6. Katz N, Chaves A, Pellegrino J. A simple device for quantitative stool thick smear technique in schistosomiasis mansoni. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 1972;14:397-400.
7. Le W, You J, Yang Y. Studies on the efficacy of artemether in experimental schistosomiasis. *Acta Pharm Sin* 1982;17:187-93.
8. Le W, You J, Mei J. Chemotherapeutic effect of artesunate in experimental schistosomiasis. *Acta Pharm Sin* 1983;18:619-21.
9. Passos ADC, Amaral RS. Esquistossomose mansônica: aspectos epidemiológicos e de controle. *Rev Soc Bras Med Trop* 1998;31(Supl 2):61-74.
10. Pellegrino J, Siqueira AF. Técnica de perfusão para colheita de *Schistosoma mansoni* em cobaias experimentalmente infectadas. *Rev Bras Malariol* 1956;8:589-97.
11. Utzinger J, Xiao SH, N'goran EK, Bergquist R, Tanner M. The potential of artemether for the control of schistosomiasis. *Int J Parasit* 2001;31:1549-62.
12. Xiao SH, Catto BA. In vitro and in vivo studies of the effect of Artemether on *Schistosoma mansoni*. *Antimicrob Agents Chemother* 1989;33:1557-62.
13. Xiao SH, Chollet J, Weiss NA, Bergquist RN, Tanner M. Preventive effect of artemether in experimental animals infected with *Schistosoma mansoni*. *Parasitol Int* 2000;49:19-24.
14. Yin JW, Yang YQ, Xiao SH, Li Y, Jiang HJ. Comparative studies on histological and histochemical alterations of *Schistosoma japonicum* induced by arteether and artemether. *Acta Pharmacol Sin* 1991;12:478-80.
15. Yue WJ, You JQ, Mei JY. Effects of artemether on *Schistosoma japonicum* adult worms and ova. *Acta Pharmacol Sin* 1984;5:60-3.