

## EVALUACIÓN DE NUEVAS FORMULACIONES DE FÁRMACOS ANTIHELMÍNTICOS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ESQUISTOSOMIASIS

### *Evaluation of New Formulations of Antihelmintic Drugs for the Treatment of Schistosomiasis*

Sergio A. CASTRILLEJO; Julio LÓPEZ ABÁN; Antonio MURO

Laboratorio de Inmunología Parasitaria y Molecular, Grupo e-INTRO, IBSALCIETUS (Instituto de Investigación Biomédica de Salamanca - Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales de la Universidad de Salamanca), Facultad de Farmacia, Universidad de Salamanca, Salamanca, España

Correo-e: sealca@usal.es; aban@usal.es; ama@usal.es)

Claudio J. SALOMÓN

Área Técnica Farmacéutica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Argentina.

IQUIR, CONICET, Argentina

Marta PASTOR NAVARRO; José Luis PEDRAZ

NanoBioCel Group, Universidad del País Vasco, Escuela de Farmacia, Paseo de la Universidad 7. 01006 Vitoria-Gasteiz, España.

Centro de Investigación Biomédica en Red de Bioingeniería, Biomateriales y Nanomedicina (CIBER-BBN). Vitoria-Gasteiz, España.

**RESUMEN:** La esquistosomosis es una enfermedad causada por parásitos trematodos del género *Schistosoma*. Afecta principalmente a áreas tropicales y subtropicales, siendo un principal problema de salud mundial por su alta incidencia en estas regiones. Una de las especies de mayor importancia,

por su prevalencia y gravedad, es la causada por *Schistosoma mansoni*, responsable de la esquistosomosis intestinal. El tratamiento de elección es el praziquantel, con altas tasas de eficacia clínica. Sin embargo, el fármaco no impide la reinfección y se ha observado fallos terapéuticos en zonas endémicas. Por ello, se hace necesaria la búsqueda de alternativas terapéuticas. El objetivo de este estudio es evaluar dos tipos de formulaciones de nanopartículas de praziquantel (tipo A y tipo S) y un tratamiento alternativo como la ivermectina mediante ensayos *in vitro* sobre adultos de *S. mansoni*. Los resultados demostraron que el tratamiento con nanopartículas presenta una eficacia similar o mayor que el empleo de praziquantel comercial. Sin embargo, el tratamiento con ivermectina no aportó evidencias de mayor eficacia. Trabajos futuros irán encaminados a evaluar estas formulaciones en otras fases del ciclo biológico, así como a realizar estudios *in vivo* en animales de experimentación.

*Palabras clave:* Schistosoma; esquistosomosis; praziquantel; nanopartículas; ivermectina.

**ABSTRACT:** Squistosomiasis is a disease caused by trematode parasites of *Schistosoma* genus. It mainly affects tropical and subtropical areas, remains a major global health problem because of its high incidence in these regions. One of the most important species, because of its prevalence and severity, is *Schistosoma mansoni*, responsible for intestinal schistosomiasis. The treatment of choice is praziquantel, which exhibit high rates of clinical efficacy. However, this drug doesn't prevent reinfection and therapeutic failure is frequently observed in endemic areas. Therefore, the search for therapeutic alternatives is urgently required. The objective of this assay was to evaluate in-vitro two types of praziquantel nanoparticles formulations (type A and type S) and, also, an alternative treatment with ivermectin against the adult stage of *S. mansoni*. The results showed that treatment with such nanoparticles has a similar or better efficiency than the available praziquantel powder. However, treatment with ivermectin didn't provide evidence of greater effectiveness. Futures studies will be carried out to evaluate these formulations in different biological phases, as well as to perform *in vivo* studies using an experimental model.

*Key words:* Schistosoma; schistosomosis; praziquantel; nanoparticles; ivermectin.

## 1. INTRODUCCIÓN

La esquistosomosis es la enfermedad causada por trematodos del género *Schistosoma*. Está distribuida en áreas tropicales y subtropicales, encontrándose en 78 países, de los cuales en 52 es endémica. En 2014, 258 millones de personas necesitaron tratamiento preventivo, siendo el 90% originarias de África (OMS, 2016).

El género *Schistosoma* tiene cinco especies que parasitan al ser humano. De todas ellas, *Schistosoma mansoni* es responsable de esquistosomosis intestinal en África y América, la segunda con mayor prevalencia y número de muertes anuales después de *S. haematobium* (AMSE, 2013). La transmisión requiere colecciones de agua dulce, donde habitan los hospedadores intermediarios (*Biomphalaria* spp. para *S. mansoni*). El ciclo comienza con la entrada de las cercarias a través de la piel desde el agua. Posteriormente, migran por el torrente sanguíneo hasta el pulmón, y después a las venas del plexo portal-mesentérico, donde alcanzan la fase adulta que libera los huevos (Muro *et al.*, 2010). Desde el punto de vista clínico puede aparecer durante la fase aguda de la enfermedad un cuadro febril, acompañado de manifestaciones cutáneas, eosinofilia, etc., denominada fiebre de Katayama y una reacción granulomatosa reactiva a la presencia de huevos atrapados en diferentes tejidos en fase crónica.

El praziquantel (PZQ) es el fármaco de elección, con tasas de curación de hasta un 85-90%. Es eficaz contra la fase adulta pero no lo es tanto contra las fases juveniles –*esquistosómula*– (Doenhoff *et al.*, 2008). El praziquantel pertenece a la clase II de la clasificación biofarmacéutica, que se caracteriza por una baja solubilidad y por tanto, baja absorción por vía oral. Estos dos inconvenientes plantean fallos terapéuticos en pacientes infectados, con altas tasas de reinfección, donde también se ha encontrado tolerancia al fármaco (Ismail *et al.*, 1999). Una aproximación para resolver estos inconvenientes es la formulación de nanopartículas lipídicas de praziquantel (*Solid Lipid Nanoparticles*, SLN), de alta eficacia de encapsulación y estabilidad, que aumentan el tiempo de permanencia en el tracto gastrointestinal y facilitan la absorción del fármaco (Ribeiro de Souza *et al.*, 2014).

En esta búsqueda de alternativas también se está valorando la inclusión de otros fármacos antihelmínticos como la ivermectina (IV), evaluado en diferentes trabajos previos y con resultados no concluyentes (Withworth *et al.*, 1991; Shoop *et al.*, 1995; Hemen *et al.*, 2014; Taman *et al.*, 2014).

## 2. OBJETIVO

El objetivo del trabajo es determinar mediante ensayos *in vitro* la eficacia del praziquantel formulado en nanopartículas y de la ivermectina frente a la fase adulta de *Schistosoma mansoni*.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1. Animales

Se utilizaron ratones CD1 (Charles River) con pesos de 25-35 g para la obtención de los adultos de *S. mansoni*. Todos los procedimientos cumplieron con la legislación de experimentación animal (L32/2007, L6/2007 y RD53/2013) y fueron aprobados por el Comité de Bioética de la USal (48531).

### 3.2. Fármacos

El PZQ utilizado como control positivo (PZQc) se obtuvo de tabletas de *Biltricide*® (Bayer Vital, Leverkusen, Germany) que fueron pulverizadas. Se utilizó el polvo disuelto en agua purificada con 1% de etanol en baño a 40°C para obtener una concentración de 1mM. Las nanopartículas fueron elaboradas por el Área Técnica Farmacéutica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, de la Universidad Nacional de Rosario (Rosario, Argentina) y por el Laboratorio de Farmacia, Escuela de Farmacia de la Universidad del País Vasco (Vitoria, España). Se sintetizaron mediante un proceso de emulsión O/W y posterior homogenización a alta velocidad. Posteriormente, para conseguir un tamaño reducido de las partículas se realizó una dispersión en frío a 3400 rpm y se cristalizaron obteniendo así un tamaño de partícula de  $396,8 \pm 2,8$  nm. Se evaluaron dos tipos de SLN-PZQ: sin solvente (PZQ-S) y con acetona (PZQ-A), que contenían 0,6611 mg en 10 mg polvo y 0,6696 mg en 10 mg polvo, respectivamente. Posteriormente se disolvieron 7,08 mg de polvo PZQ-S y 6,998 mg de polvo de PZQ-A en 1,5 ml de agua destilada en un baño a 40°C (Sonic and Materials Inc, Danbury, CT) (Scalise *et al.*, 2015). La ivermectina (*Paramectin*®, Syva, León, Spain), también se preparó a una concentración de 1mM en agua destilada.

### 3.3. Mantenimiento, recolección y cultivo de los parásitos

*Schistosoma mansoni* se mantuvo en caracoles *Biomphalaria glabrata* en cubetas con agua mineral a 25°C y ratones CD1, ambos con ciclo luz/oscuridad de 12/12-h. Se recogieron las cercarias de los caracoles infectados con 7-9 miracidios

y se infectaron ratones con 150 cercarias/ratón. Se procedió a la extracción de los adultos a la 6ª semana postinfección desde la vena porta de ratones eutanasiados con una dosis letal de 100 mg/kg de pentobarbital administrado intraperitonealmente. También se empleó heparina (2 UI/ml) para facilitar la recogida de los parásitos. Los vermes adultos se lavaron en PBS estéril a 37°C para eliminar los restos de fluidos biológicos y se mantuvieron en medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino, 2% L-Glutamina (*Sigma, San Louis, EEUU*), 100 UI/ml de Penicilina (*Sigma*) y 100 µg/ml de Estreptomicina (*Sigma*) a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> (Tucker *et al.*, 2013).

### 3.4. *Ensayo in vitro de la actividad esquistosomicida*

Tras 24 h en 2 ml de medio RPMI suplementado en una placa de 24 pocillos (*Costar*), los esquistosomas adultos fueron tratados con concentraciones de 1, 5 y 10 µM de nanopartículas PZQ S o A para valorar su eficacia respecto a PZQ comercial (PZQc). También se utilizó ivermectina comercial (IV) a una concentración de 10 µM. Cada concentración utilizada, así como los correspondientes controles, se realizaron por triplicado. La viabilidad de los parásitos a las 24, 48 y 72 h se evaluó empleando un microscopio estereoscópico (*CK2, Olympus*), una video cámara (*AM423, Dino-Lite digital microscope*) y un software (*DinoCapture 2.0 software, Dino-Lite digital microscope*) para el procesado de las grabaciones.

Para valorar la viabilidad de los parásitos además se utilizó el ensayo colorimétrico MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide). Esta técnica está basada en la capacidad de las mitocondrias de las células vivas de reducir MTT en formazán, un compuesto de color morado medible por espectrofotometría. Después de aplicar los tratamientos, los parásitos se introdujeron individualmente en una placa de 96 pocillos con 100 µl de PBS/pocillo con una concentración 0,5 mg MTT/ml, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Posteriormente se retiró el PBS y se añadieron 200 µl/pocillo de DMSO para disolver los cristales de formazán, a temperatura ambiente durante 1 h. Después se midió la absorbancia de cada pocillo mediante un lector ELISA a 550 nm (Yepes *et al.*, 2014).

### 3.5. *Análisis de los datos*

Los resultados se expresaron como media ± desviación típica. Las diferencias entre grupos fueron identificadas utilizando la prueba estadística no paramétrica Kruskal-Wallis, utilizando el programa SPSS 21 (IBM).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1. Comparación PZQ-S y PZQ comercial.

En cuanto al tratamiento con PZQ-S ensayado a los 3 tiempos de estudio, observamos que existen diferencias estadísticamente significativas entre el grupo No tratado y al resto de tratamientos ensayados a los tres tiempos, con un valor de  $p < 0,0001$ . Por otra parte, el grupo tratado con PZQc a las 24 h también muestra diferencias estadísticamente significativas con las concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,002$ ) y 5  $\mu\text{M}$  ( $p = 0,004$ ), pero no con la concentración de 10  $\mu\text{M}$ . Sin embargo, a partir de las 48 h ya no existen diferencias debido a que el comportamiento del PZQ-S a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  es similar al grupo tratado con PZQc, y a partir de las 48 h, las tres concentraciones de PZQ-S muestran esa similitud con el grupo de PZQc. Por lo tanto, la eficacia del PZQ-S se hace notable a las 24 h a una concentración igual que el control, mientras que a las 48 h, la reducción en la supervivencia de los parásitos se hace notable a cualquiera de las tres concentraciones de PZQ-S (Figura 1. A). La reducción en los porcentajes de supervivencia a las 24 h con una concentración de PZQ-S de 10  $\mu\text{M}$  es muy próxima a la que muestra el PZQc (14,9% y 9,6%, respectivamente), y es aún más próxima a las 72 h (3,7% y 2,8%, respectivamente).

La observación microscópica demostró la presencia de cambios morfológicos, como alteración del tegumento, y parálisis de los parásitos, similares entre los grupos PZQc y PZQ-S 10  $\mu\text{M}$  (Figura 2. A).

### 4.2. Comparación PZQ-A y PZQ comercial

Podemos observar que el PZQ-A presenta mayor eficacia que el PZQc comparando los tres tiempos ensayados. Observamos que a las 24 h existen diferencias estadísticamente significativas en la concentración de 1  $\mu\text{M}$  al comparar con PZQc ( $p = 0,016$ ), pero no existe para las concentraciones 5  $\mu\text{M}$  y 10  $\mu\text{M}$ . Incluso, a partir de las 48 h no hay diferencias significativas usando PZQ-A a 1  $\mu\text{M}$ . Estos datos nos indican que a las 24 h, la eficacia del PZQ-A es muy similar a la que encontramos con PZQc para unas concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$ , mientras que a las 48 h, la eficacia del PZQ-A 1  $\mu\text{M}$  es más alta que el PZQc. Observamos que el PZQ-A a la misma concentración que el PZQc muestra una mayor eficacia en la reducción de la supervivencia del parásito a las 24 h y 72 h (5,9% y 9,9%, respectivamente). La reducción de la supervivencia se hace notable a cualquiera de las tres concentraciones de PZQ-A, mostrando una mayor eficacia que el PZQc (Figura 1. B).

La observación por microscopía mostró atresia e inhibición de la motilidad de los adultos desde una concentración de 5  $\mu$ M utilizando PZQ-A, de forma muy similar a los cambios que sufren con el PZQc (Figura 2. B).

#### 4.3. Comparación IV y PZQ comercial

El empleo de IV en el ensayo, no muestra eficacia significativa entre el grupo no tratado y el tratado con IV 10  $\mu$ M a las 24 h. En el grupo tratado con el PZQc muestra una eficacia del 90% en ese mismo tiempo ( $p=0,036$ ). Si comparamos ambos grupos a las 48 y 72 h, siguen existiendo esas diferencias significativas entre el grupo IV y el PZQc, aportando unas tasas de supervivencia de 28,2% en el caso de IV respecto al 3,2% que produce el PZQc a las 72 h (Figura 1. C). Por lo tanto, el tratamiento con IV no resulta eficaz para producir un daño en el parásito.

Se puede observar que no existe una alteración significativa del parásito si lo observamos por microscopía, mostrando parálisis del parásito, pero sin producir alteraciones visibles de su morfología (Figura 2. C).

### 5. CONCLUSIONES

El PZQ contenido en las nanopartículas produce una reducción significativa de la supervivencia del parásito, similar o mayor a la observada con el PZQc. Esto podría explicarse debido al aumento de solubilidad del producto y por el tamaño de partícula, que contribuiría a un mejor acceso a las estructuras del parásito.

La ivermectina produce una parálisis del adulto de *S. mansoni* sin alterar su estructura, mostrando poca actividad anti-*Schistosoma*. Sin embargo, la parálisis que produce como consecuencia de su interacción con el flujo del Cl<sup>-</sup> sería interesante en una terapia combinada con PZQ, para producir una sinergia que facilite la destrucción de los parásitos.

El tratamiento más efectivo ha sido el del PZQ-A, que permite reducciones significativas en la supervivencia, incluso a una dosis menor de la utilizada con PZQ comercial. Este hecho puede ser debido a la inclusión de acetona a la formulación, que permite un mayor contacto con el tegumento del parásito, produciendo un acceso más directo del fármaco. Estos resultados aconsejan estudios *in vivo* para considerar este tratamiento como una alternativa óptima al tratamiento actual con PZQ.

### 6. AGRADECIMIENTOS

Deseamos agradecer a Edward Yepes Victoria y Juan Hernández Goenaga por la ayuda con los cultivos y el mantenimiento del ciclo biológico de *Schistosoma*

*mansoni*. Proyectos IBSAL (IBY15/00003), ISCIII (DTS16/00207) y RICET-ISCIII (RD16/0027/0018, RD12/0018/0002 y RD06/0022/1004). Los autores agradecen el apoyo financiero de la Universidad de Rosario y CONICET (Argentina) y de la Universidad del País Vasco, UPV/EHU (UFI11/32). También se agradece a la Unidad de Formulaciones de Drogas (U10) del CIBER (CIBER-BBN) de la Universidad del País Vasco.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

- AMSE.es [Internet]. España: Asociación de Médicos de Sanidad Exterior; 2011 [actualizado Abril 2013; acceso Junio 2016]. Disponible en: <http://www.amse.es>.
- Doenhoff MJ, Cioli D, Utzinger J. Praziquantel: mechanism of action, resistance, and new derivatives of Schistosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2008; 21: 659-667.
- Gryseels B, Karja P, Clerinx J, Kestens L. Human schistosomiasis. *Lancet*. 2006; 368: 1106-18.
- Hemen A, Kela SL, Istifanus WA. Chemotherapeutic Trials of Praziquantel and Ivermectin on victims of Urinary Schistosomiasis in Taraba North Senatorial District. *Sci-Afric Journal of Scientific Issues*. 2014; 2(4):156-159.
- Ismail M, Botros S, Metwally S, Farghally A, Tao LF, Day TA *et al*. Resistance to praziquantel: direct evidence from *Schistosoma mansoni* isolated from Egyptian villagers. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1999; 60:932-935.
- Muro A, Pérez del Villar L, Velasco V, Pérez Arellano JL. Infecciones por trematodos. *Medicine*. 2010; 10(53):3171-28.
- Ribeiro de Souza AL, Andreani T, Nunes de Oliveira R, Princila Kiill C, Kolenyak dos Santos F, Marques Allegretti S *et al*. In vitro evaluation of permeation, toxicity and effect of praziquantel-loaded solid lipid nanoparticles against *Schistosoma mansoni* as a strategy to improve efficacy of the schistosomiasis treatment. *International Journal of Pharmaceutics*. 2014; 463:31-37.
- Scalise ML, Arrúa EC, Rial MS, Esteva MI, Salomon CJ, Fichera LE. Promising Efficacy of Benzimidazole Nanoparticles in Acute *Trypanosoma cruzi* Murine Model: In-Vitro and In-Vivo Studies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2016. PMID: 27246447.
- Shoop WL, Ostlind DA, Rohrer SP, Mickle G, Haines HW, Michael BF *et al*. Avermectins and Milbemycins Against *Fasciola hepatica*: In Vivo Drug Efficacy and In Vitro Receptor Binding. *International Journal for Parasitology*. 1995; 25(8):923-927.
- Taman A, Samar EB, Nora ET, Amira EH, Manar A. Evaluation of the in vivo effect of ivermectin on *Schistosoma mansoni* in experimentally-infected mice. *Journal of Coastal Life Medicine*. 2014; 2(10):817-823.
- Tucker MS, Karunaratne LB, Lewis FA, Freitas TC, Liang YS. Schistosomiasis. *Current Protocols in Immunology*. 2013; 19(1):1-58. doi:10.1002/0471142735.im1901s103.



- Whitworth JA, Morgan D, Maude GH, McNicholas AM, Taylor DW. A field study of the effect of ivermectin on intestinal helminths in man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1991; 85(2):232-4.
- WHO.int [Internet]. *Organización Mundial de la Salud* [actualizado Enero 2016; citado Junio 2016]. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs115/es/>
- Yepes E, Varela-M RE, López-Abán J, Rojas-Caraballo J, Muro A, Mollinedo F. 2015. Inhibition of Granulomatous Inflammation and Prophylactic Treatment of Schistosomiasis with a Combination of Edelfosine and Praziquantel. *PLoS Neglected Tropical Disease*. 2015; 9(7): e0003893. doi:10.1371/journal.pntd.0003893
- Yepes E, Varela-M RE, López-Abán J, Habib Dakir EL, Mollinedo F, Muro A. In Vitro and In Vivo Anti-Schistosomal Activity of the Alkylphospholipid Analog Edelfosine. *PLoS ONE*. 2014; 9(10): e109431. doi:10.1371/journal.pone.0109431

FIGURAS

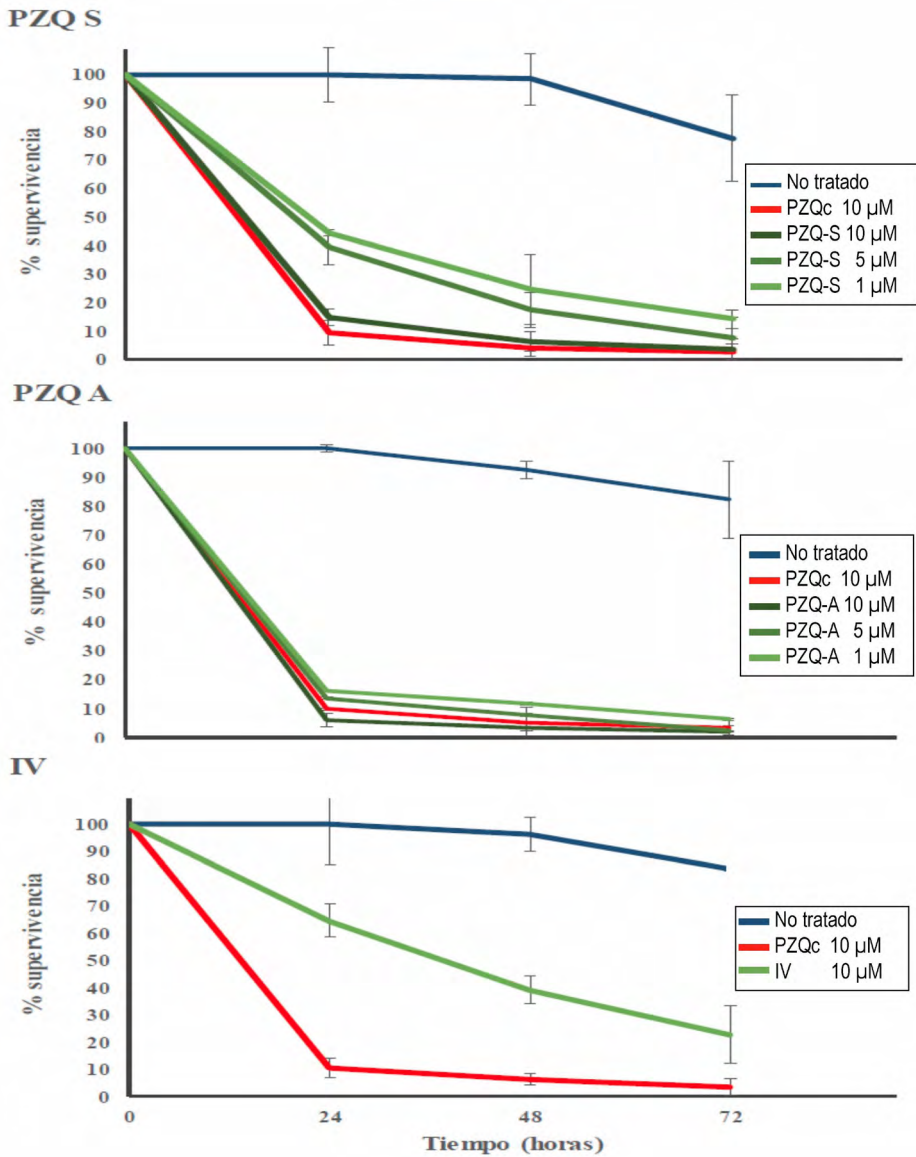


Figura 1. Porcentajes de adultos de *Schistosmas mansoni* supervivientes tras el tratamiento con PZQ-S, PZQ-A o IV *in vitro*. Se utilizaron adultos sin tratar y tratados con praziquantel comercial (PZQc) a 10  $\mu$ M como testigos.

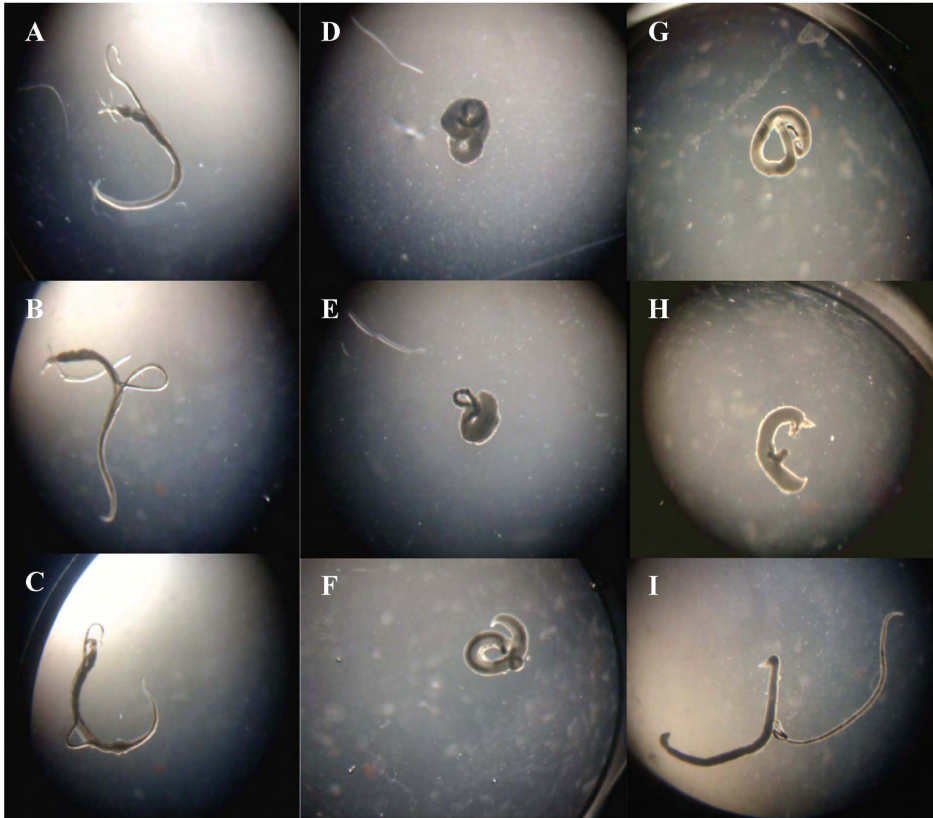


FIGURA 2. Adultos de *Schistosomas mansoni* representativos de cada grupo tras el tratamiento *in vitro* con PZQ-S, PZQ-A o IV comparados con los controles no tratados y tratados con praziquantel comercial (PZQc) 10  $\mu$ M: A, B, C No Tratados. D, E, F: Tratados con PZQc. G, Tratamiento con PZQ-S 10  $\mu$ M, H, tratamiento con PZQ-A 10  $\mu$ M e I: tratamiento con IV 10  $\mu$ M.

