

Efeito Antiparasitário da Huperzina A em Vermes Adultos de *Schistosoma mansoni*

DOI 10.5281/zenodo.11130343

Lucas Fukui-Silva¹

Rayssa Araujo Cajas²

Daniel Brenneisen Roquini^{3,*}

¹Biomédico e Mestrando no Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas (NPDN), Universidade Guarulhos. Email: lufukuisilva@gmail.com

²Biomédica, Mestra e Doutoranda pelo Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, Universidade Guarulhos (NPDN-UNG). Email: daniel.roquini@outlook.com

³Doutor pelo Núcleo de Pesquisa em Doenças Negligenciadas, Universidade Guarulhos (NPDN-UNG) e Pesquisador do NPDN-UNG. Email: daniel.roquini@outlook.com

* autor correspondente: daniel.roquini@outlook.com

RESUMO

A esquistossomose, causada por helmintos do gênero *Schistosoma*, é uma doença parasitária que afeta mais de 250 milhões de pessoas em todo o mundo. Considerada uma Doença Negligenciada, o tratamento da esquistossomose é baseado no uso de apenas um fármaco, Praziquantel, cujo uso levanta preocupações sobre o surgimento de parasitas tolerantes/resistentes. Diante desse cenário, faz-se necessária nova alternativa terapêutica visando o tratamento da esquistossomose e outras helmintíases. Huperzina A é um composto sesquiterpênico insaturado de natureza alcalóide, encontrado em plantas do gênero *Huperzia*, espécie denominada *Huperzia serrata*, apresentando uma diversidade de propriedades biológicas e farmacológicas. **Objetivo:** Avaliar o efeito da Huperzina A em camundongos experimentalmente infectados com *Schistosoma mansoni*. **Métodos:** Atividade antiparasitária da Huperzina A foi avaliada *in vitro* frente aos vermes adultos de *Schistosoma mansoni*. Resultados: *In vitro*, Huperzina A, apresentou atividade esquistossomicida (LC50 = 200 µg/ml). **Conclusão:** Em conjunto, considerando a importância do reposicionamento de extratos naturais para Doenças Negligenciadas, os resultados deste estudo indicam o potencial da Huperzina A para tratamento da esquistossomose.

Palavras-chave: antiparasitário, esquistossomose, reposicionamento de fármacos, produto natural, *in vitro*.

ABSTRACT

Schistosomiasis, caused by helminths of the genus *Schistosoma*, is a parasitic disease that affects over 250 million people worldwide. Considered a Neglected Disease, the treatment of schistosomiasis relies on the use of a single drug, Praziquantel, the use of which raises concerns about the emergence of tolerant/resistant parasites. Given this scenario, a new therapeutic alternative is necessary for the treatment of schistosomiasis and other helminthiasis. Huperzine A is an unsaturated sesquiterpene alkaloid compound found in plants of the *Huperzia* genus, specifically in the species known as *Huperzia serrata*, exhibiting a variety of biological and pharmacological properties.

Objective: To evaluate the effect of Huperzine A on mice experimentally infected with *Schistosoma mansoni*. **Methods:** The antiparasitic activity of Huperzine A was assessed *in vitro* against adult *Schistosoma mansoni* worms. **Results:** *In vitro*, Huperzine A demonstrated schistosomicidal activity (LC50 = 200 µg/ml). **Conclusion:** Overall, considering the importance of repurposing natural extracts for Neglected Diseases, the results of this study indicate the potential of Huperzine A for the treatment of schistosomiasis.

Keywords: antiparasitic, schistosomiasis, drug repurposing, natural product, *in vitro*.

1. INTRODUÇÃO

A esquistossomose é uma doença tropical negligenciada provocada por trematódeos sanguíneos, pertencentes ao gênero *Schistosoma*. Ela continua sendo um problema significativo em mais de 70 nações, sendo a segunda doença parasitária humana mais relevante após a malária, com mais de 200 milhões de pessoas infectadas e cerca de 800 milhões vivendo sob risco de infecção. ⁽¹⁾ As complicações da esquistossomose incluem fibrose hepática e intestinal (*S. mansoni*, *S. japonicum*, *S. intercalatum* e *S. mekongi*), e fibrose ureteral e vesical, além de calcificação do trato geniturinário (*S. haematobium*). ⁽²⁾

Os esquistossomos possuem ciclos de vida complexos que envolvem hospedeiros vertebrados (geralmente um mamífero) e hospedeiros invertebrados (caramujos de água doce). Os seres humanos geralmente são infectados pela penetração de cercárias através da pele quando entram em contato com água doce contaminada. ⁽³⁾ Após a penetração na pele humana, as larvas em desenvolvimento (esquistossômulos) requerem cerca de 5 a 7 semanas antes de se tornarem adultos e produzirem ovos. Os ovos são eliminados no ambiente através das fezes ou urina (*S. haematobium*) ou são retidos nos tecidos do hospedeiro, onde induzem inflamação e depois morrem. ⁽⁴⁾ Os ovos que alcançam a água doce eclodirão, liberando miracídeos ciliados de vida livre que infectam um hospedeiro de caramujo adequado. No caramujo, o parasita passa por uma replicação assexual por meio de estágios de esporocisto mãe e filha, eventualmente liberando dezenas de milhares de cercárias na água, que são capazes de causar novas infecções em humanos. ⁽⁵⁾

Dado o papel crítico que essas condições desempenham na saúde global, a Organização Mundial da Saúde lançou em 2021 um novo roteiro para doenças negligenciadas com estratégias para acelerar o controle e eliminação de helmintíases e outras doenças associadas à pobreza até 2030. Conforme destacado no roteiro da OMS, a quimioterapia para indivíduos de risco em regiões endêmicas é o principal método de controle de infecções causadas por helmintos. ⁽⁶⁾

O conhecimento insuficiente sobre a doença, a carência de infraestrutura sanitária adequada e a ausência de políticas de saúde eficazes contribuem para a propagação da esquistossomose em países onde a doença é endêmica. Sem uma vacina eficaz disponível, o controle da esquistossomose depende principalmente de um único medicamento, o praziquantel (PZQ), que tem sido utilizado em programas de distribuição em massa desde os anos 1970. O PZQ oferece alta eficácia no tratamento, é

bem tolerado, apresenta poucos efeitos colaterais transitórios, pode ser administrado por via oral e possui um custo competitivo. Estudos também demonstraram sua capacidade de reduzir a fibrose em camundongos infectados com esquistossomos. ⁽⁷⁻⁸⁾ No entanto, mesmo considerando essas vantagens, confiar exclusivamente em um único medicamento para uma doença que afeta mais de 200 milhões de pessoas é arriscado. A resistência ao PZQ, tanto em estudos de campo quanto em laboratório, já foi observada em diversas pesquisas. Além disso, o PZQ tem eficácia limitada contra vermes imaturos presentes em infecções recentes. Portanto, há uma urgente necessidade de desenvolver novos medicamentos esquistossomicidas. ⁽⁹⁾

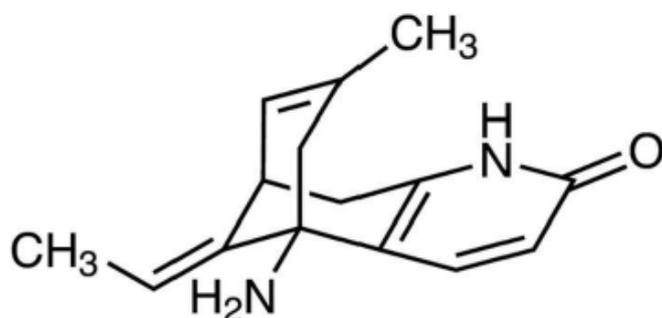
Considerando a dificuldade em descobrir novos esquistossomicidas, uma alternativa promissora pode estar nos extratos naturais. A biodiversidade do Brasil desempenha um papel crucial na descoberta de medicamentos devido à sua vasta variedade de ecossistemas e espécies únicas. A floresta amazônica, por exemplo, é uma das regiões mais biodiversas do mundo e abriga uma riqueza inigualável de plantas, animais e microrganismos com potencial terapêutico. Muitas comunidades indígenas há séculos utilizam plantas medicinais da região para tratar uma variedade de doenças. ⁽¹⁰⁾

Além da Amazônia, outros biomas brasileiros, como a Mata Atlântica, o Cerrado e o Pantanal, também oferecem uma grande diversidade de espécies com propriedades medicinais. Pesquisadores têm explorado esses recursos naturais em busca de novos compostos bioativos que possam ser utilizados no desenvolvimento de novos medicamentos. A biodiversidade brasileira continua a ser uma fonte inestimável de novos fármacos e compostos terapêuticos, proporcionando esperança para o tratamento de uma variedade de doenças, desde enfermidades tropicais negligenciadas até condições crônicas como o câncer e doenças neurodegenerativas. ^(11,12) No entanto, é crucial que esses recursos sejam explorados de maneira sustentável e responsável, garantindo a preservação dos ecossistemas e o respeito aos conhecimentos tradicionais das comunidades locais. Esses extratos são produzidos por uma variedade de organismos em diferentes ambientes, com destaque para as plantas como fontes principais desses compostos. Os extratos naturais têm sido alvo de intensa investigação devido às suas propriedades bioativas, como os terpenoides encontrados nos óleos essenciais. As plantas funcionam como verdadeiras fábricas químicas, produzindo uma vasta gama de metabólitos secundários, como taninos, terpenos, alcaloides e flavonoides, que têm potencial para o tratamento de doenças humanas. ⁽¹¹⁻¹⁴⁾

Hodiernamente, estão em andamento estudos para descobrir novos compostos bioativos com atividade farmacológica contra a esquistossomose. Vários extratos naturais já foram identificados como tendo atividade contra o parasita *Schistosoma*, incluindo extratos de plantas como a artemisinina e a curcumina. Outros modelos mostram-se promissores, com a identificação de compostos bioativos contra diferentes parasitas, como em estudos voltados para a malária, leishmaniose, esquistossomose e tripanossomíase. O uso de extratos naturais para desenvolver novos fármacos para a esquistossomose pode ser uma alternativa promissora e econômica, especialmente em áreas onde o acesso aos medicamentos é limitado. ⁽¹⁵⁾

A Huperzina A é um composto alcaloide insaturado do tipo sesquiterpeno encontrado em certas espécies vegetais, como o *Huperzia serrata*. Essa planta é conhecida na medicina tradicional chinesa como "Qian Ceng Ta" e tem sido utilizada para tratar condições como esquizofrenia, edemas e perda de memória. A Huperzina A (Figura 1), desperta grande interesse devido às suas propriedades farmacológicas e aos seus potenciais benefícios para a saúde. ⁽¹⁶⁾

Figura 1- Estrutura química da Huperzina A



A Huperzina A se destacou inicialmente pela sua capacidade de inibir a enzima acetilcolinesterase (AChE), responsável pela degradação do neurotransmissor acetilcolina. Essa inibição resulta no aumento dos níveis de acetilcolina no cérebro, potencialmente melhorando a função cognitiva e a memória. Portanto, a Huperzina A tem sido investigada como uma possível terapia para doenças neurodegenerativas, como o Mal de Alzheimer. ⁽¹⁷⁾ Além do seu potencial neurológico, a Huperzina A despertou interesse devido à sua atividade contra parasitas. Evidências sugerem que ela pode interferir no sistema nervoso do parasita, afetando sua mobilidade e capacidade de adesão às células hospedeiras. Essas descobertas indicam um possível potencial

terapêutico da Huperzina A no tratamento da esquistossomose. Com o objetivo de descobrir novas alternativas de tratamento de doenças negligenciadas, o presente trabalho avaliou a atividade *in vitro* de Huperzina A em vermes adultos de *S. mansoni*. No entanto, as pesquisas nesse campo ainda estão em estágios iniciais, e são necessários estudos adicionais para compreender completamente o potencial de ação da Huperzina A contra o verme adulto do *Schistosoma mansoni*.

2.MATERIAL E MÉTODOS

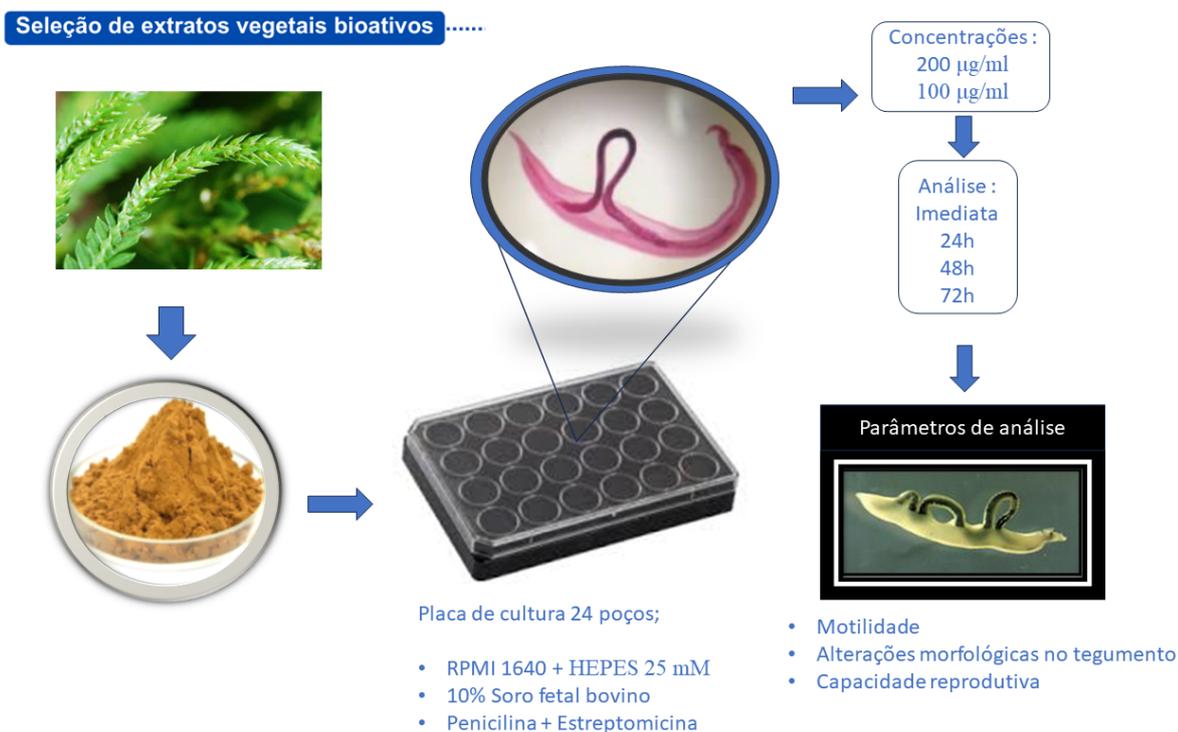
2.1 Avaliação da atividade anti-helmíntica *in vitro*

Todos os ensaios anti-helmínticos serão realizados no laboratório do Pesquisador Responsável, cujos procedimentos estão especificados em diversos artigos do grupo.¹⁸⁻²⁰ Para seleção de extratos vegetais bioativos, todas as amostras serão testadas em adultos de *S. mansoni* na concentração de 200 µg/mL. Cada concentração é testada em triplicata e os experimentos são repetidos pelo menos uma vez. Em todos os ensaios, foram usados como controle positivo (praziquantel), enquanto poços contendo somente meio de cultura e o veículo (comumente DMSO 0.5%) foram usados como controle negativo.

2.2 Ensaios com *S. mansoni*

O parasito (linhagem BH) é mantido em caramujos *Biomphalaria glabrata* (hospedeiro intermediário) e camundongos *Mus musculus* (hospedeiro definitivo).²¹ Os experimentos com adultos de *S. mansoni*, obtidos por perfusão 42 dias após infecção, serão realizados com machos e fêmeas acasalados em placas de 24 poços (1 casal/poço) contendo 2 mL de meio RPMI 1640 tamponado com HEPES 25 mM, antibióticos (penicilina 100 U/ml e estreptomicina 100 µg/ml) e suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os vermes serão incubados com as amostras (em diferentes concentrações) por até 72 horas (37 °C, 5% CO₂) e monitorados microscopicamente considerando os seguintes parâmetros: atividade motora (motilidade), alterações morfológicas no tegumento e a capacidade reprodutiva. A mortalidade dos helmintos foi julgada pela ausência de movimentos durante 1 minuto ou quando tocados com uma pinça.²¹ (**Figura 2**)

Figura 2- Delineamento do estudo *in vitro* realizado para investigar a atividade anti-*Schistosoma* da Huperzina A.

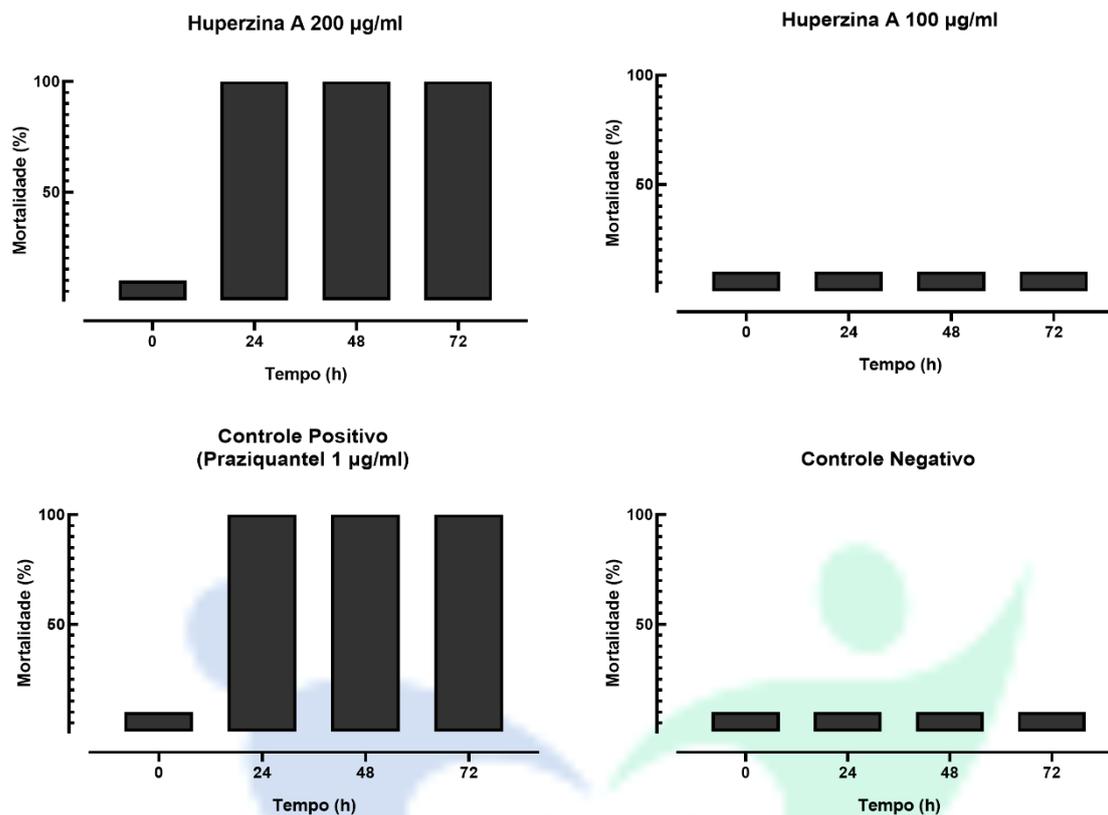


FASE 1: Seleção de extratos vegetais bioativos: Huperzina A, encontrado em plantas do gênero *Huperzia*, especialmente em *Huperzia serrata* são preparados para testes *in vitro*. Nesta etapa, todas as amostras serão testadas na concentração inicial de 200 µg/mL. FASE 2: Avaliação do efeito antiparasitário de Huperzina A: As amostras ativas serão testadas em concentrações inferiores para determinação da EC50.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O sesquiterpeno insaturado de natureza alcaloide, Huperzina A, encontrado em plantas do gênero *Huperzia*, especialmente em *Huperzia serrata*, demonstrou uma gama significativa de propriedades biológicas e farmacológicas na medicina tradicional. Neste estudo, investigamos a atividade anti-*Schistosoma* da Huperzina A por meio de abordagens *in vitro*. Concentrações de 200, 100 µg/ml de Huperzina A foram testadas para determinar a EC50. **(Figura 3)** Esses resultados sugerem que a Huperzina A pode ser um candidato promissor para o tratamento da esquistossomose, oferecendo uma resposta terapêutica rápida e eficaz.

Figura 3 - Efeitos *in vitro* de Huperzina A em vermes adultos de *S. mansoni* com 49 dias de idade



Ao longo de um período de 72 horas, com avaliações realizadas a cada intervalo de 24 horas, notamos uma significativa diminuição na motilidade tanto dos vermes machos quanto das fêmeas, culminando na morte dos parasitas, especialmente evidente na concentração de 200 µg/ml. Esse efeito atingiu seu ápice entre as 48 e 72 horas de exposição ao tratamento. Quando os esquistossomos adultos foram mantidos na ausência do extrato (grupo controle), os parasitas revelaram atividade motora normal, com peristaltismo natural do intestino.

A notável atividade antiparasitária da Huperzina A ressalta suas perspectivas como uma terapia inovadora ou complementar no combate à esquistossomose, potencialmente se tornando um novo fármaco valioso. No entanto, é essencial aprofundar nossa compreensão dos mecanismos subjacentes que impulsionam a ação benéfica da Huperzina A contra o parasita. Além disso, é imperativo expandir a pesquisa para incluir modelos animais mais sofisticados e, eventualmente, realizar ensaios clínicos em pacientes humanos. Isso permitirá uma avaliação abrangente da eficácia e segurança da Huperzina A como tratamento para a esquistossomose.

4. CONCLUSÃO

A pesquisa demonstrou que a Huperzina A possui uma notável atividade anti-*Schistosoma*, destacando seu potencial como uma terapia promissora no tratamento da

esquistossomose. No entanto, para traduzir esses resultados promissores em benefícios clínicos tangíveis, é essencial uma compreensão mais aprofundada dos mecanismos subjacentes. Além disso, é crucial expandir os estudos para incluir modelos animais mais sofisticados e, eventualmente, ensaios clínicos em humanos. Esses passos são fundamentais para avaliar completamente a eficácia e segurança da Huperzina A como um potencial tratamento inovador ou complementar para a esquistossomose, proporcionando esperança para uma abordagem terapêutica mais eficaz e ágil.

5. Referências bibliográficas

- 1- World Health Organization. Schistosomiasis, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/schistosomiasis>.
- 2- Silva MP, de Oliveira RN, Mengarda AC, Roquini DB, Allegretti SM, Salvadori MC, Teixeira FS, de Sousa DP, Pinto PLS, da Silva Filho AA, de Moraes J. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Sep;50(3):467-472. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.06.005.
- 3- Azevedo CM, Meira CS, da Silva JW, Moura DMN, de Oliveira SA, da Costa CJ, Santos ES, Soares MBP. Therapeutic Potential of Natural Products in the Treatment of Schistosomiasis. *Molecules*. 2023 Sep 26;28(19):6807. doi: 10.3390/molecules28196807.
- 4- Dias MM, Zuza O, Riani LR, de Faria Pinto P, Pinto PLS, Silva MP, de Moraes J, Ataíde ACZ, de Oliveira Silva F, Cecílio AB, Da Silva Filho AA. *In vitro* schistosomicidal and antiviral activities of *Arctium lappa* L. (Asteraceae) against *Schistosoma mansoni* and *Herpes simplex virus-1*. *Biomed Pharmacother*. 2017 Oct;94:489-498. doi: 10.1016/j.biopha.2017.07.116.
- 5- de Castro CC, Costa PS, Laktin GT, de Carvalho PH, Geraldo RB, de Moraes J, Pinto PL, Couri MR, Pinto Pde F, Da Silva Filho AA. Cardamonin, a schistosomicidal chalcone from *Piper aduncum* L. (Piperaceae) that inhibits *Schistosoma mansoni* ATP diphosphohydrolase. *Phytomedicine*. 2015 Sep 15;22(10):921-8. doi: 10.1016/j.phymed.2015.06.009.

- 6- Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030. World Health Organization. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240010352>.
- 7- Lago EM, Xavier RP, Teixeira TR, Silva LM, da Silva Filho AA, de Moraes J. Antischistosomal agents: state of art and perspectives. *Future Med Chem.* 2018 Jan;10(1):89-120. doi: 10.4155/fmc-2017-0112. Epub 2017 Dec 13.
- 8- Ren R, Wang X, Leas DA, Häberli C, Cal M, Dong Y, Kaiser M, Keiser J, Vennerstrom JL. Antischistosomal tetrahydro- γ -carboline sulfonamides. *Bioorg Med Chem Lett.* 2022 Mar 1;59:128546. doi: 10.1016/j.bmcl.2022.128546.
- 9- Bergquist R, Utzinger J, Keiser J. Controlling schistosomiasis with praziquantel: How much longer without a viable alternative? *Infect Dis Poverty.* 2017 Mar 28;6(1):74. doi: 10.1186/s40249-017-0286-2.
- 10- Moraes J, Ghilardi Lago JH. Natural products as lead compounds for treatment of neglected tropical diseases: dream or reality? *Future Med Chem.* 2022 Nov;14(22):1607-1609. doi: 10.4155/fmc-2022-0245.
- 11- Pavani TFA, Cirino ME, Teixeira TR, de Moraes J, Rando DGG. Targeting the *Schistosoma mansoni* nutritional mechanisms to design new antischistosomal compounds. *Sci Rep.* 2023 Nov 13;13(1):19735. doi: 10.1038/s41598-023-46959-3.
- 12- Sessa DP, Mengarda AC, Simplicio PE, Antar GM, Lago JHG, de Moraes J. 15 β -Senecieryl-oxy-ent-kaur-16-en-19-oic Acid, a Diterpene Isolated from *Baccharis lateralis*, as Promising Oral Compound for the Treatment of Schistosomiasis. *J Nat Prod.* 2020 Dec 24;83(12):3744-3750. doi: 10.1021/acs.jnatprod.0c01050.
- 13- Roquini V, Mengarda AC, Cajas RA, Martins-da-Silva MF, Godoy-Silva J, Santos GA, Espírito-Santo MCC, Pavani TFA, Melo VA, Salvadori MC, Teixeira FS, Rando DGG, de Moraes J. 2023. The Existing Drug Nifuroxazide as an Antischistosomal

Agent: *In Vitro*, *In Vivo*, and *In Silico* Studies of Macromolecular Targets. *Microbiol Spectr* 11:e01393-23.

14- Ueno AK, Barcellos AF, Costa-Silva TA, Mesquita JT, Ferreira DD, Tempone AG, Romoff P, Antar GM, Lago JHG. Antitrypanosomal activity and evaluation of the mechanism of action of diterpenes from aerial parts of *Baccharis retusa* (Asteraceae). *Fitoterapia*. 2018 Mar; 125:55-58. doi: 10.1016/j.fitote.2017.12.016.

15- de Carvalho LSA, Silva LM, de Souza VC, da Silva MPN, Capriles PVSZ, de Faria Pinto P, de Moraes J, Da Silva Filho AA. Cardamonin Presents *in Vivo* Activity against *Schistosoma mansoni* and Inhibits Potato Apyrase. *Chem Biodivers*. 2021 Nov;18(11):e2100604. doi: 10.1002/cbdv.202100604.

16- Friedli MJ, Inestrosa NC. Huperzine A and Its Neuroprotective Molecular Signaling in Alzheimer's Disease. *Molecules*. 2021 Oct 29;26(21):6531. doi: 10.3390/molecules26216531. PMID: 34770940; PMCID: PMC8587556.

17- Huang XT, Qian ZM, He X, Gong Q, Wu KC, Jiang LR, Lu LN, Zhu ZJ, Zhang HY, Yung WH, Ke Y. Reducing iron in the brain: a novel pharmacologic mechanism of huperzine A in the treatment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2014 May;35(5):1045-54. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2013.11.004. Epub 2013 Nov 13. PMID: 24332448.

18- Brito JR, Wilairatana P, Roquini DB, Parra BC, Gonçalves MM, Souza DCS, Ferreira EA, Salvadori MC, Teixeira FS, Lago JHG, de Moraes J. Neolignans isolated from *Saururus cernuus* L. (Saururaceae) exhibit efficacy against *Schistosoma mansoni*. *Sci Rep*. 2022 Nov 11;12(1):19320. doi: 10.1038/s41598-022-23110-2. PMID: 36369516; PMCID: PMC9652300.

19- Silva TC, Mengarda AC, Silva BC, Relvas-Lima TS, Rodrigues VC, Salvadori MC, Teixeira FS, Lopes AF, Rando DG, Moraes J. New evidence for tamoxifen as an antischistosomal agent: *in vitro*, *in vivo* and *target fishing* studies. *Future Med Chem*. 2021 Jun;13(11):945-957. doi: 10.4155/fmc-2020-0311.

20- Silva MP, de Oliveira RN, Mengarda AC, Roquini DB, Allegretti SM, Salvadori MC, Teixeira FS, de Sousa DP, Pinto PLS, da Silva Filho AA, de Moraes J. Antiparasitic activity of nerolidol in a mouse model of schistosomiasis. *Int J Antimicrob Agents*. 2017 Sep;50(3):467-472. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.06.005.

21- Oliveira LVF, Camilo FF, Soares MG, Cajas RA, Cirino ME, de Moraes J, Lago JHG. In Situ Preparation of Dehydrodieugenol-Loaded Silver Nanoparticles and their Antischistosomal Activity. *Chem Biodivers*. 2024 Mar;21(3):e202301929. doi: 10.1002/cbdv.202301929.

