

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

**Pesquisa e desenvolvimento de um novo antiparasitário para administração
oral em cães**

Bruno Cabral Chagas

Pelotas, 31 de Agosto de 2023.

Bruno Cabral Chagas

**Pesquisa e desenvolvimento de um novo antiparasitário para administração
oral em cães**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Márcia de Oliveira Nobre

Coorientador: Leandro Quintana Nizoli

Pelotas, Agosto de 2023

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação da Publicação

C426p Chagas, Bruno Cabral

Pesquisa e desenvolvimento de um novo antiparasitário para administração oral em cães [recurso eletrônico] / Bruno Cabral Chagas ; Márcia de Oliveira Nobre, orientadora ; Leandro Quintana Nizoli, coorientador. — Pelotas, 2023.
88 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2023.

1. *Toxocara* sp. 2. *Ancylostoma* sp. 3. *Giardia* sp. 4. Vermífugo. 5. Pets. I. Nobre, Márcia de Oliveira, orient. II. Nizoli, Leandro Quintana, coorient. III. Título.

CDD 636.708951

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Bruno Cabral Chagas

Pesquisa e desenvolvimento de um novo antiparasitário para administração oral em
cães

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da realização do exame: 31/08/2023

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Márcia de Oliveira Nobre (Orientadora)
Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Fabiane Grecco
Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Pelotas

Dr^a. Sabrina de Oliveira Capella
Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Dr^a. Mariana Teixeira Tillman
Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

**A Ane, meu esteio e templo de vida e meus queridos pais, fontes que bebi e
sempre beberei.**

Agradecimentos

Agradeço a Ane, minha companheira de amor e vida, sem ti nada disso seria possível, te amo.

Meus pais, por me incentivarem e abrirem os caminhos que trilho há anos, obrigado.

Aos pequenos da minha família que restauram cada dia a vontade de seguir adiante.

A melhor orientadora que a veterinária poderia ter me apresentado Professora Marcia de Oliveira Nobre, obrigado por tudo desde sempre.

Aos colegas de Clinpet pelos sete anos aqui vividos, colegas da pós graduação, estagiários, obrigado.

Ao Laboratório IBASA LTDA, por apostar nessa parceria, juntamente com o PhD Rubens Alves Pereira, obrigado.

Ao laboratório de virologia veterinária da UFPel pela oportunidade em realizar as análises do projeto.

Ao biotério central de Pelotas, pelo apoio no manejo dos animais.

A ong A4 de Capão do Leão pela parceria na realização da disponibilidade de material.

A ong quatro patas de Santo Antônio das Missões por ceder seu espaço, voluntários e os cães para realização do projeto.

Ao professor Rodrigo de Almeida Vaucher pela parceria na realização dos testes de hemotoxicidade.

Ao Vinícius Farias de Campos pelo desenvolvimento do programa Doutorado Acadêmico para Inovação junto ao CNPq.

Ao Setor de convênios e a Coordenação de Inovação Tecnológica da UFPel pelo apoio ao desenvolvimento do projeto e o registro dos resultados junto ao INPI.

A UFPel, em especial o Programa de Pós-Graduação em Veterinária por possibilitar a realização do doutorado e a infraestrutura para o desenvolvimento do projeto.

A CAPES pelo apoio inicial dessa jornada, com a concessão de bolsa de doutorado nos primeiros meses.

Ao CNPq pela concessão de bolsa de doutorado junto ao edital Doutorado Acadêmico para Inovação.

Enfim, ao mundo que aqui deixo e ao que ingresso muito obrigado.

“O Brasil tá galopando e cheguei à conclusão, se não sigo com os que avançam fico de freio na mão”.

Barbosa Lessa

Resumo

CHAGAS, Bruno Cabral. **Pesquisa e desenvolvimento de um novo antiparasitário à base de nitazoxanida para administração oral em cães.** 2023. 88f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2023.

A nitazoxanida (NTZ) é um antiparasitário que possui uma importante e ampla ação frente a agentes microbianos, helmintos (como *Toxocara* sp. e *Ancylostoma* sp.) e protozoários (como *Giardia* sp.). No entanto, no Brasil até o momento não existem formulações que façam uso dessa molécula no tratamento destes parasitos em animais. Tendo em vista, que os parasitos fazem parte da cadeia zoonótica, despertam preocupação dentro do âmbito clínico e epidemiológico da veterinária por seu largo potencial infeccioso e também pelo crescente aumento da resistência as medicações padrão usadas no tratamento destas infecções, afirma-se a importância da pesquisa de antiparasitários seguros e com baixa capacidade de desenvolvimento de resistência. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade e eficácia da nitazoxanida isolada e associada a, ivermectina, pirantel, febantel e praziquantel *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*. Foram realizados testes de eficácia *in vitro* sobre ovos de *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp e *Giardia* sp pela metodologia de filtragem e recuperação de estruturas parasitárias e teste de toxicidade e degradação do tapete celular em células renais MDCK e MDBK com leitura da degradação por espectofotometria. Foi realizado o teste de hemotoxicidade para avaliação de hemólise, sendo utilizado como controle positivo uma solução detergente e controle negativo uma solução alcalina para avaliação do potencial de degradação de hemácias. Para realização do experimento *ex vivo*, foi utilizado o modelo de irritabilidade ocular em olhos de frango, sendo computado em diferentes tempos, o nível de irritabilidade dos globos oculares sobre a instilação de NTZ associada e isolada sendo utilizado como controle negativo soro fisiológico. Nos testes *in vivo* em modelo murino, foi realizada a análise de eficácia do produto na dosagem terapêutica por redução da contaminação parasitária de ovos de *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp e *Giardia* sp. Já a análise de toxicidade aguda e crônica foi realizada pela administração do produto em dose terapêutica, sobredose e subdose, sendo avaliados os sinais clínicos, avaliação comportamental e alteração dos parâmetros bioquímicos renais e hepáticos. A análise estatística foi realizada através de porcentagem, contagem de redução de ovos para determinação e Kruskal-Wallis. Nos estudos de citotoxicidade *in vitro* foi demonstrado que quanto mais alta a dose de NTZ maior era a destruição celular renal em células MDCK. As concentrações acima de 30mg/kg apresentaram alta potencial de controle (98%) porém, com alta (97%) toxicidade celular. Assim a concentração da NTZ foi diminuída, a exemplo a de 10mg/kg utilizada no produto aqui proposto no qual obtivemos uma alta eficácia, e uma diminuição da toxicidade *in vitro* para 25%. Os dados expressos pelo uso da NTZ isolada no controle da *Giardia* sp, foram muito expressivos, visto que alcançaram o patamar de 99%, seguidos de 98% para *Toxocara* sp e 86% contra *Ancylostoma* sp. Já os testes de toxicidade sugeriram que o produto na concentrações terapêutica, testada projeta grande segurança visto que o mesmo não apresentou toxicidade. Os testes de eficácia *in vitro* demonstraram que o produto proposto (NTZ, pirantel, febantel, praziquantel e ivermectina) obteve alto potencial de eficácia no controle de nematódeos, alcançando níveis que

variaram de 95% (*Ancylostoma* sp) a 98% (*Toxocara* sp). Frente a *Giardia* sp, chegou na marca de 99% de eficácia, enquanto o controle positivo do estudo representado pelo uso associado de pirantel, febantel, praziquantel (antiparasitário de uso convencional para cães) obteve níveis de controle de nematódeo de 73% para *Ancylostoma* sp, 85% para *Toxocara* sp e contra *Giardia* sp 75%. Conclui-se que a ação da NTZ como agente simbótico com outros antiparasitários foi extremamente notável, a ponto de ser considerada como um excelente parasiticida até mesmo em testes com a espécie alvo, principalmente em virtude de sua capacidade de eliminação das diferentes estruturas de nematódeos e protozoários. Nesse sentido a NTZ pode vir a ser uma excelente alternativa de controle antiparasitário.

Palavras chave: *Toxocara* sp; *Ancylostoma* sp; *Giardia* sp; vermífugo; pets.

Abstract

CHAGAS, Bruno Cabral. Research and development of a new nitazoxanide-based antiparasitic for oral administration in dogs and cats. 2023. 88f. Thesis (Doctorate in Sciences) - Graduate Program in Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2023.

Nitazoxanide (NTZ) is an antiparasitic that has an important and wide action against microbial agents, helminths (such as *Toxocara* sp. and *Ancylostoma* sp.) and protozoa (such as *Giardia* sp.). However, in Brazil so far there are no formulations that make use of this molecule in the treatment of these parasites in animals. Bearing in mind that the parasites are part of the zoonotic chain, arousing concern within the clinical and epidemiological scope of veterinary medicine due to its wide infectious potential and also due to the increasing resistance to standard medications used in the treatment of these infections, the importance of research on safe antiparasitics with low capacity for resistance development. The objective of this work was to evaluate the toxicity and efficacy of nitazoxanide alone and associated with ivermectin, pyrantel, febantel and praziquantel *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo*. *In vitro* efficacy tests were carried out on eggs of *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp and *Giardia* sp by filtering methodology and recovery of parasitic structures and test of toxicity and degradation of the cell tapetum in kidney MDCK and MDBK cells with degradation reading by spectrophotometry. A hemotoxicity test was performed to assess hemolysis, using a detergent solution as a positive control and an alkaline solution as a negative control to assess the potential for degradation of red blood cells. To carry out the *ex vivo* experiment, the model of ocular irritability in chicken eyes was used, being computed at different times, the level of irritability of the eyeballs on the instillation of NTZ associated and isolated, being used as a negative control saline solution. In the *in vivo* tests in a murine model, the analysis of the efficacy of the product in the therapeutic dosage was carried out by reducing the parasitic contamination of eggs of *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp and *Giardia* sp. The analysis of acute and chronic toxicity was performed by administering the product at a therapeutic dose, overdose and underdose, evaluating clinical signs, behavioral assessment and changes in renal and hepatic biochemical parameters. Statistical analysis was performed using percentage, egg reduction count for determination and Kruskal-Wallis. *In vitro* cytotoxicity studies demonstrated that the higher the dose of NTZ, the greater the renal cell destruction in MDCK cells. Concentrations above 30mg/kg showed high control potential (98%) but with high (97%) cellular toxicity. Thus, the concentration of NTZ was reduced, like the 10mg/kg used in the product proposed here, in which we obtained high efficacy, and a decrease in *in vitro* toxicity to 25%. The data expressed by the use of isolated NTZ in the control of *Giardia* sp, were very expressive, since they reached the level of 99%, followed by 98% for *Toxocara* sp and 86% against *Ancylostoma* sp. The toxicity tests suggested that the product at therapeutic concentrations, tested, projects great safety since it did not show toxicity. The *in vitro* efficacy tests demonstrated that the proposed product (NTZ, pyrantel, febantel, praziquantel and ivermectin) obtained a high potential of efficacy in the control of nematodes, reaching levels that varied from 95% (*Ancylostoma* sp) to 98% (*Toxocara* sp). Against *Giardia* sp, it reached the mark of 99% of effectiveness, while the positive control of the study represented by the

associated use of pyrantel, febantel, praziquantel (antiparasitic of conventional use for dogs) obtained levels of nematode control of 73% for *Ancylostoma* sp , 85% for *Toxocara* sp and against *Giardia* sp 75%. It was concluded that the action of NTZ as a symbiotic agent with other antiparasitics was extremely remarkable, to the point of being considered as an excellent parasiticide even in tests with the target species, mainly due to its capacity to eliminate the different structures of nematodes and protozoa. In this sense, NTZ can become an excellent alternative for antiparasitic control.

Keywords: *Toxocara* sp; *Ancylostoma* sp; *Giardia* sp; vermifuge; pets.

Lista de figuras

Figura 1	Animais de companhia parasitoses.....	X 2
Figura 2	<i>Ancylostoma</i> spp.: ovo, larva e ciclo do parasito.....	24
Figura 3	<i>Toxocara</i> spp.: ovo, larva e ciclo do parasito.....	25
Figura 4	<i>Giardia</i> spp.: ovo, larva e ciclo do parasito.....	26
Figura 5	Medicamentos antiparasitários.....	28
Figura 6	Molécula da nitazoxanida (NTZ.....	30

Artigo 1

Figura 1 Placa corada com MTT em teste de toxicidade da molécula NTZ nas várias concentrações demonstrando alta viabilidade celular nos poços de coloração roxa e morte celular nos poços de coloração amarelada. Nas células renais linhagem CRIB (esquerda) e sobre células renais linhagem MDCK (Direita).....

41

Figura 2 Célula MDCK submetida a concentração de 100 mg/mL de NTZ (Esquerda) com intensa degradação tecidual do tapete celular e controle celular (Direita) demonstrando tapete celular íntegro.....

41

Figura 3 Efeito hemolítico sob hemácias de cães, felinos e equinos dos compostos a base de nitazoxanida (Nita. ou Nit), pirantel (pir. ou piran.), praziquantel (praziq. ou praz.), febantel (feb.) e ivermectina (iverm.) (10; 5; 15, 5; 02 mg/mL respectivamente), controle negativo (ctrl -) na concentração de 35%.....

43

Figura 4 Efeito hemolítico sob hemácias de cães, felinos e equinos dos compostos a base de nitazoxanida (Nita. ou Nit), pirantel (pir. ou piran.), praziquantel (praziq. ou praz.), febantel (feb.) e ivermectina (iverm.) (10; 5; 15, 5; 02 mg/mL respectivamente), controle negativo na concentração de 100%.....

44

Figura 5 Efeito hemolítico sob hemácias de cães, felinos e equinos dos compostos a base de nitazoxanida (Nita. ou Nit), pirantel (pir. ou piran.), praziquantel (praziq. ou praz.), febantel (feb.) e ivermectina (iverm.) (10; 5; 15, 5; 02 mg/mL respectivamente), controle negativo na concentração de 45

200%.....

Lista de tabelas

Artigo 1

Tabela 1	Eficácia antiparasitária da NTZ isolada e associada com ivermectina, febantel, pirantel e praziquantel na redução da viabilidade dos ovos do parasito <i>Ancylostoma</i> in vitro.	39
Tabela 2	Demonstração dos dados de eficácia da nitazoxanida (NTZ) isolada e em associação com pirantel, febantel, praziquantel e pirantel.....	40
	...	
Tabela 3	Viabilidade de células Mardin-Darby de rim canino (MDCK) e de células (CRIB) submetidas ao tratamento com diferentes diluições de NTZ (NTZ)	41
Tabela 4	Valores médios de absorbância de concentrado de hemácias de cães, felinos e equinos submetidos a teste de hemólise com NTZ (NTZ), pirantel, praziquantel, febantel e ivermectina 10; 5; 15; 5; 0,2 mg/mL respectivamente), controle negativo e controle positivo, todos nas concentrações de 200%, 100% e 35%.	43

Artigo 2

Tabela 1	Produtos administrados por grupos experimentais por parasito estudado, <i>Toxocara</i> sp, <i>Giardia</i> sp e <i>Ancylostoma</i> sp.	56
Tabela 2	Concentração dos antiparasitários presentes nas formulações dos produtos 1 e 2.....	60
Tabela 3	Demonstração da média dos dados de eficácia <i>in vivo</i> em modelo murino da nitazoxanida (NTZ) isolada e em associação com NTZ isolada e em associação com pirantel, febantel, praziquantel e pirantel.	62

Artigo 3

Tabela 1	Valores de eficácia antiparasitária das formulações 1 e 2 sobre <i>Ancylostoma</i> sp., <i>Toxocara</i> sp. e <i>Giardia</i> sp com base nas contaminações iniciais e finais..	73
Tabela 2	Valores de eficácia antiparasitária residual das formulações 1 e 2 sobre <i>Ancylostoma</i> sp., <i>Toxocara</i> sp. e <i>Giardia</i> sp nos dias 7, 14 e 21 pós tratamento.....	74

Lista de abreviatura e símbolos

CRIB- Células MDBK

FDA- Food drug administration

FEB- Febantel

MDCK- Mardin-Darby de rim canino

MMT -brometo de [3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]

NaCl -cloreto de sódio

NTZ-Nitazoxanida

OECD - Guideline for the Testing of Chemicals

PFOR- piruvato ferrodoxina oxidoredutase

Sumário

1 Introdução.....	18
2 Revisão da Literatura.....	20
3 Artigos.....	31
3.1 Artigo 1- Avaliação da atividade e toxicidade in vitro da nitazoxanida (NTZ) isolada e associada frente a diferentes parasitos: um estudo prévio de uma alternativa terapêutica no tratamento de parasitoses em animais de companhia.....	31
3.2 Artigo 2 - Eficácia e toxicidade da administração <i>in vivo</i> de nitazoxanida (NTZ) isolada e em associação com ivermectina, febantel, pirantel e praziquantel em modelo murino.	49
3.3. Artigo 3- Eficácia da nitazoxanida (NTZ) no tratamento de infecções parasitárias causadas por <i>Ancylostoma</i> spp., <i>Toxocara</i> sp. e <i>Giardia</i> sp. em cães.....	65
4 Considerações finais.....	79
5 Referências.....	80
Anexos.....	83

1. Introdução

Os animais domésticos, por ocuparem papel tão importante dentro do âmbito familiar nos dias de hoje, acabam convivendo junto a seus tutores compartilhando de hábitos comportamentais e alimentares (BRAGANÇA et al., 2020). Hoje em dia, mais da metade das pessoas em todo o mundo tem pelo menos um animal de estimação vivendo com elas, sendo, mais comum os cães (JENKINS, 2020). No Brasil, existem por volta de mais de 80 milhões de pets distribuídos pelo país (MOSQUETE, 2020).

Algumas infecções causadas por parasitos como nematódeos (como *Toxocara* sp. e *Ancylostoma* spp.) e protozoários (como *Giardia* sp.) estão se espalhando em várias áreas do mundo. Dessa maneira, essas doenças afetam a saúde e bem estar dos animais, são uma das principais causas de morbidade mundial, sendo este um problema de saúde pública que necessita de um quadro de gestão global (OMS 2012; OMS/UNICEF 2015).

Essas doenças prejudicam o desenvolvimento do animal, e existem diversos sinais clínicos como diarreia, vômitos, perda de peso, obstrução intestinal, anemia, anorexia, dentre outros (TRAVERSA, 2012). Especificamente os quadros de giardíase em animais de companhia tem crescido nos últimos anos (EIRNASSON et. al, 2016). Ainda, as infecções causadas por *Giardia* sp. são reconhecidas como um dos principais contribuintes globais para doenças diarreicas em humanos e outros mamíferos (ANKARKLEV et al.2010).

Pelos aspectos acima, o tratamento de animais parasitados pode ser desafiador por causa de regimes longos e resistência a medicamentos (Ryan e ZAHEDI, 2019). Além disso, falhas terapêuticas no mesmo estão relacionadas a reinfecção, a baixa adesão que envolve alto custo, dificuldade na administração, e um elevado número de efeitos colaterais (ROMANO et al.,2023). Porém, nos últimos anos alguns produtos antiparasitários que estão presentes no mercado possuem um efeito benéfico em virtude da capacidade da manutenção de níveis sanguíneos, o que acabaria por eliminar a dificuldade expressa pela necessidade de repetidas aplicações e risco de desenvolvimento de resistência (PRICHARD et al., 2019). Dentre estes pode-se citar a nitazoxanida (NTZ) (MORON-SOTO et al., 2017).

A NTZ, uma benzamida sintética, é um antiparasitário de amplo espectro que graças a sua farmacologia, bioquímica e tecnologia empregada na sua estruturação, apresenta baixa capacidade de desenvolvimento de resistência em parasitos, sendo ainda que sua composição molecular, lhe confere uma importante e ampla ação frente a agentes microbianos e a helmintos, giardíases, criptosporidíases e amebíases em animais e em humanos com interrupção de importantes vias metabólicas necessárias para sua sobrevivência e proliferação (BRUNO et al., 2010). A atividade protozoaricida da molécula é resultado do impedimento da transferência de elétrons da via anaeróbica dependente de enzima piruvato ferrodoxina/flavodoxina oxioreduktase (PFOR) de protozoários que priva os parasitos de uma intensa forma de obtenção de energia exaurindo a capacidade de manutenção dos mesmos (ARTECHE et al., 2013). Já frente a helmintos, a NTZ inibe a polimerização da tubulina que por conseguinte, atravessa a capacidade de replicação e motilidade do DNA de nematódeos. Isso causa a imobilização dos parasitos por ações destrutivas das células do intestino e tegumentares dos mesmos (REINOSO e WHITE., 2017).

Para que uma molécula a exemplo da NTZ seja liberada para uso veterinário, são necessários alguns testes pré-clínicos necessários os quais são de extrema importância, visto que compreendem estudos de eficácia e toxicidade *in vitro*, *ex vivo* e posteriormente a estes, ocorre a avaliação *in vivo* (SPAGNUOLO et al., 2010). Poder inserir no mercado de produtos antiparasitários veterinários um medicamento como a NTZ com baixa capacidade de desenvolvimento de resistência, comprovada segurança e praticidade do seu uso é de grande importância para o meio veterinário e para a saúde única, no conceito de *one health*, aonde se trabalha o indivíduo, os animais e o meio ambiente (SHOMAKER et al., 2013). Nesse sentido, como NTZ é uma molécula que apresenta importantes efeitos farmacológicos, amplamente usada em humanos, este estudo tem como objetivo avaliar o potencial e adaptação da NTZ isolada e em associação com pirantel, febantel praziquantel e ivermectina como antiparasitário, protozoaricida, nematodicida e cestodicida bem como sua toxicidade afim de desenvolvimento de produto comercial.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Investigar o potencial e adaptação da molécula NTZ isolada e em associação com pirantel, febantel praziquantel e ivermectina como antiparasitário, protozoaricida, nematodicida e cestodicida bem como sua toxicidade afim de desenvolvimento de produto comercial.

2.2. Objetivos Específicos

- Avaliar a eficácia *in vitro* da molécula NTZ isolada ou em associação com ivermectina, febantel, pirantel e praziquantel sobre parasitos de cães e gatos.
- Estudar a toxicidade *in vitro* da molécula NTZ isolada ou em associação com ivermectina, febantel, pirantel e praziquantel.
- Verificar a toxicidade ocular da NTZ isolada ou em associação com ivermectina, febantel, pirantel e praziquantel em modelo *ex vivo*.
- Estudar em modelo murino a eficácia de formulação composta por NTZ (10 mg/mL) associada com Pirantel (5 mg/mL), febantel (15mg/mL), praziquantel (5mg/mL) e ivermectina (0,2mg/mL) frente aos helmintos *Ancylostoma* sp e *Toxocara* sp e ao protozoário *Giardia* sp.
- Estudar a toxicidade aguda e crônica de formulação composta por NTZ (10mg/mL) associada com Pirantel (5 mg/mL)+febantel (15mg/mL)+praziquantel (5mg/mL)+ivermectina (0,2mg/mL) em modelo murino.
- Avaliar em cães a eficácia de formulação composta por NTZ (10 mg/mL) associada com Pirantel (5 mg/mL), febantel (15mg/mL), praziquantel (5mg/mL) e ivermectina (0,2mg/mL) frente aos helmintos *Ancylostoma* sp e *Toxocara* sp e ao protozoário *Giardia* sp.
- Observar o efeito da administração do produto composto por NTZ (10mg/mL) associada com Pirantel (5 mg/mL)+febantel (15mg/mL)+praziquantel (5mg/mL)+ivermectina (0,2mg/mL) em cães, acerca de avaliação dos parâmetros bioquímicos renais e hepáticos.

3. Revisão bibliográfica

3.1. Animais domésticos x parasitoses

Animais domésticos como cães e gatos são animais de estimação populares em muitos países do mundo e viveram em estreita proximidade com os seres humanos por milhares de anos (TRAVERSSA et al., 2008), hoje em dia mais da metade das pessoas em todo o mundo tem pelo menos um animal de estimação vivendo com elas, sendo ,mais comum os cães (JENKINS, 2020). Além disso, mais da metade dos domicílios brasileiros, ou seja, cerca de 53% possuem, pelo menos, um cão ou um gato como membro da família, totalizando mais de 80 milhões de pets distribuídos pelo país (MOSQUETE, 2020).

De fato, o bem-estar do ser humano é melhorado através do contato e relacionamento com espécies de animais de estimação que conferem saúde fisiológica e ajuda psicológica, trazendo benefícios terapêuticos para pessoas com algumas doenças físicas e mentais (LAUN, 2003). O efeito da posse de animais de estimação na saúde humana é bem conhecido e há mérito significativo em preservar a saúde e bem-estar desses animais.

Nesse sentido, algumas infecções causadas por parasitos como nematódeos (como *Toxocara* sp. e *Ancylostoma* spp.) e protozoários (como *Giardia* sp.) estão se espalhando em várias áreas do mundo. Dessa maneira essas doenças afetam a saúde e bem estar dos animais e podem ser fatais (TRAVERSSA et al., 2008).

Durante muito tempo, os esforços dos parasitologistas veterinários têm sido direcionados para infecções parasitárias distribuídas globalmente de animais de estimação que têm impacto sobre o animal ou humano. Animais de companhia ganharam um papel relevante como reservatórios e disseminadores de zoonoses (Figura 1) que pode constituir um desafio adicional para a saúde pública em ambientes pobres de países em desenvolvimento (IRWIN e JEFFERIES 2004).

Muitas vezes há uma escassez de informações para essas infecções, principalmente devido algumas limitações no diagnóstico (TRAVERSSA et al., 2008),

e também relacionada ao tratamento destes animais de companhia parasitados tendo em vista os regimes longos de tratamento e resistência a medicamentos (RYAN e ZAHEDI, 2019). Geralmente as falhas terapêuticas no mesmo estão relacionadas a reinfecção, a baixa adesão que envolve alto custo, dificuldade na administração, e um elevado número de efeitos colaterais (ROMANO et al., 2023).

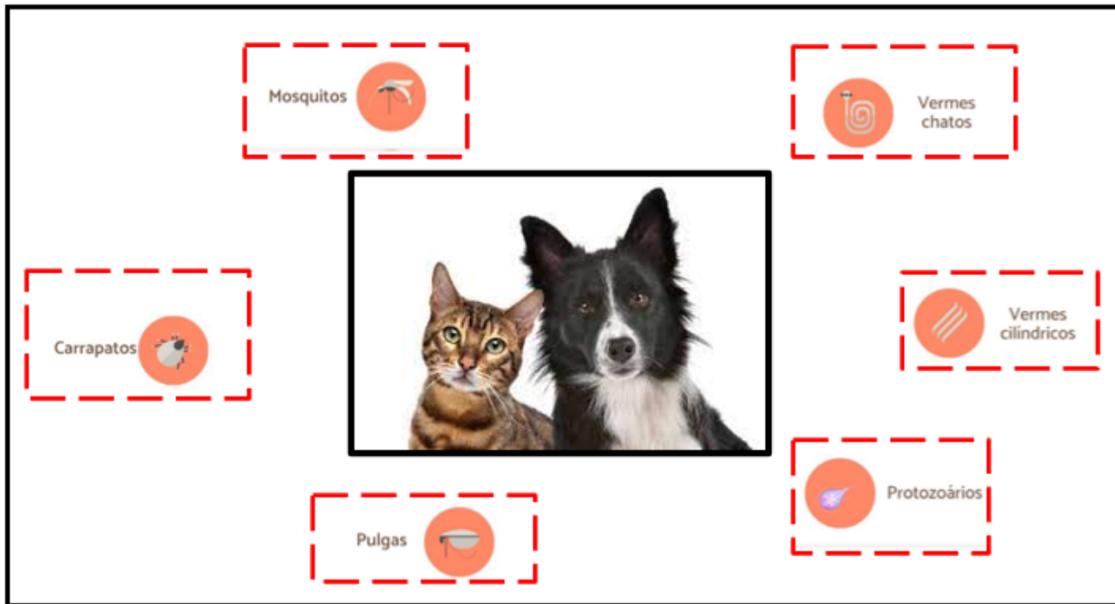


Figura 1. Principais parasitoses dos animais de companhia. (FONTE: autor)

Desta maneira o parasitismo gastrointestinal por helmintos como *Toxocara* sp., *Ancylostoma* spp, dentre outros e protozoários como *Giardia* sp. oferecem riscos à saúde animal e humana devido às alterações clínicas e transmissão de agentes potencialmente zoonóticos (de SOUZA et al., 2023).

3.2. Parasitos: *Ancylostoma* sp., *Toxocara* spp. e *Giardia* sp.

3.2.1. *Ancylostoma* sp.

Ancylostoma sp. é um parasito nematódeo que causa uma das infecções intestinais em caninos (Figura 2) mais prevalentes gerando doença subclínica em cães adultos e causando várias implicações zoonóticas (SCHMIDT, et al., 2016). Os ancolostomídeos *Ancylostoma caninum*, *Ancylostoma braziliense* e *Ancylostoma ceylanicum* estão entre os helmintos caninos mais prevalentes. A infecção é potencialmente fatal em cães jovens e subclínica em cães adultos (SCHMIDT, et al., 2016).

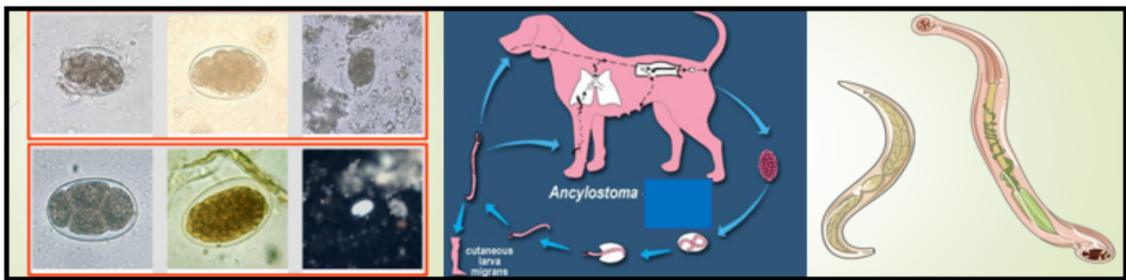


Figura 2. *Ancylostoma* sp.:Demonstração das estruturas parasitárias e o ciclo do parasito. (FONTE: autor)

Tem potencial zoonótico (TRAUB et al., 2013), como *A. braziliense*, *A. caninum*, e *A. ceylanicum* são agentes etiológicos da larva migrans cutânea humana, enterite eosinofílica, anemia e diarreia (BOWMAN, et al., 2010). No Brasil, o gênero *Ancylostoma* é o nematóide mais frequentemente detectado em cães adultos e *A. caninum* está disseminada por todo o país, apresentando sérias implicações para a saúde pública devido ao seu potencial zoonótico (DANTAS-TORRES e OTRANTO et al., 2014).

Fezes de cães, eliminadas nas cidades contaminam o ambiente com ovos e larvas de parasitas, contribuindo assim para a transmissão zoonótica. Nas regiões do sul do Brasil, São Paulo e Curitiba, solos altos *Ancylostoma* sp. contaminação foi registrada (46,8% e 40,3%, respectivamente) (TRAVERSA et al., 2014).

Ancylostoma sp. infecta o hospedeiro principalmente através da pele penetração ou pela ingestão da terceira fase da larva que atinge diretamente o intestino delgado (ANDERSON, 2000). Em cães, a infecção por *Ancylostoma* spp. geralmente resulta em diarréia, perda de sangue e anemia. Cães recém-nascidos e filhotes são de maior suscetibilidade e podem enfrentar ancolostomíase intestinal e infecções severas (MCKENNA et al., 1975). Ao contrário de *Toxocara* sp., que se associa significativamente com a idade do hospedeiro, o *Ancylostoma* sp. acomete cães em qualquer idade, apesar da maior suscetibilidade. Depois de uma fase de suscetibilidade primordial, que acompanha o desenvolvimento de uma resposta imunológica eficiente ao parasitismo, cães adultos e idosos podem tornar-se cronicamente infectados e assintomáticos (SCHMIDT et al., 2016).

Quando os cães adultos são infectados, algumas larvas invadem diferentes tecidos do corpo, como o trato gastrointestinal e os músculos esqueléticos e

entram uma fase de desenvolvimento interrompida, resiliente à maioria dos agentes quimioterápicos. Em cadelas podem ser reativados durante o estro e nas 2 a 3 semanas terminais de gestação. Eles podem então ser passados através do leite para a ninhada, pois em pelo menos uma semana após o parto (MILLER et al., 1965). Larvas de quarto estágio e vermes adultos escavam profunda e maciçamente na mucosa do intestino delgado. Os parasitas estão ativos alimentados de sangue quando presos, pelos dentes em suas globulares cápsulas bucais, na mucosa intestinal e, portanto, os sintomas podem ser graves e potencialmente fatais, especialmente em filhotes em que a doença super aguda e aguda e a perda de sangue é potencialmente fatal (BOWMAN, et al., 2010) . A infecção intestinal pode ocorrer em cadelas adultas e devido a doenças associadas à idade imunidade o parasita geralmente causa infecção subclínica nestes casos, com eliminação de ovos nas fezes, mas sem sinais clínicos (MOHAMED et al., 2009). Além disso, o *Ancylostoma* sp. pode causar infecções combinadas com outros parasitas intestinais (FERREIRA et al., 2013), bem como com doenças sistêmicas (BOWMAN, 2014).

3.2.2. *Toxocara* sp.

Toxocara sp. (Figura 3) são parasitos do gênero *Ascaris* contendo espécies de importância para a saúde humana e animal, como *Toxocara canis*, *Toxocara cati* e *Toxocara vitulorum* (RUBINSKY-ELEFANT et al., 2010). *T. canis* e *T. cati* estão entre os endoparasitas mais prevalentes em sua hospedeiros definitivos (cães e gatos), com distribuição mundial (MAGNAVAL et al., 2001). Levantamentos epidemiológicos indicam que a prevalência de *T. canis* em cães variou de 5,5% a 64,7% (DAI et al., 2009), e a prevalência de *T. cati* em gatos variou de 4,7% a 55,2% (KHALAFALLA, 2011).

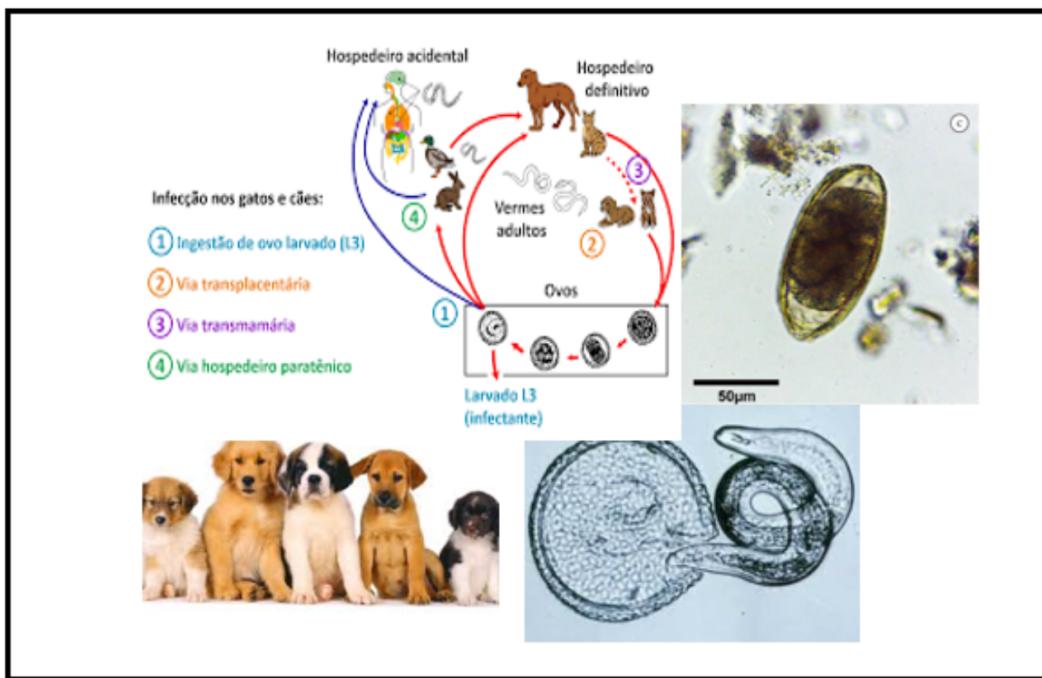


Figura 3. *Toxocara* sp.: Demonstração das estruturas parasitárias e o ciclo do parasito. FONTE: Autor.

A prevalência generalizada de *Toxocara* sp. em cães e gatos levou à contaminação de playgrounds, parques municipais e domicílios com ovos de *Toxocara* (MATTIA et al., 2012). Significativamente, os seres humanos podem ser infectados por *T. canis* e *T. cati* através da ingestão accidental de ovos embrionados. Apesar de estágios larvais são incapazes de se desenvolver em vermes adultos maduros em humanos, as larvas infecciosas de *Toxocara* podem migrar para uma variedade de tecidos, causando danos a qualquer tecido em que entrem, resultando em várias manifestações clínicas, como larva migrans visceral, larva migrans ocular, meningoencefalite eosinofílica, toxocaríase oculta e neurotoxocaríase (RUBINSKY-ELEFANT et al., 2010).

Dados epidemiológicos recentes demonstram a prevalência generalizada de infecção humana com *Toxocara*, que é provavelmente a helmintíase mais prevalente em países industrializados, representando um típico problema de saúde humana negligenciado e subestimado (LEE et al., 2010). Considerando que este parasito é endêmico em vários países, sendo presente também tantos nos países desenvolvidos como nos em desenvolvimento, e essa infecção pode ser transmitida para humanos, a mesma deve ser considerada uma ameaça à saúde humana. Desta maneira é necessário maiores investigações sobre esses parasitas para determinar

a real importância da infecção e o potencial impacto na saúde pública (JENKINS, 2020).

3.2.3. *Giardia* sp.

Giardia intestinalis (*G. lamblia*, *G. duodenalis*) é um protozoário patógeno entérico que infecta humanos, animais domésticos e animais selvagens em todo o mundo, e é reconhecido como um dos principais contribuintes globais para doenças diarreicas em humanos e outros mamíferos (ANKARKLEV et al. 2010). Existem pelo menos 7 conjuntos distintos (A-G) com base em análises genéticas (TANGTRONGSUP et al., 2010). Em regiões em desenvolvimento, a *Giardia* sp. (Figura 4) faz parte do grupo de microorganismos infecciosos que interferem na vida de uma comunidade capacidade de atingir seu potencial máximo e prejudica o desenvolvimento e a melhoria socioeconômica (SAVOLI et al., 2006).

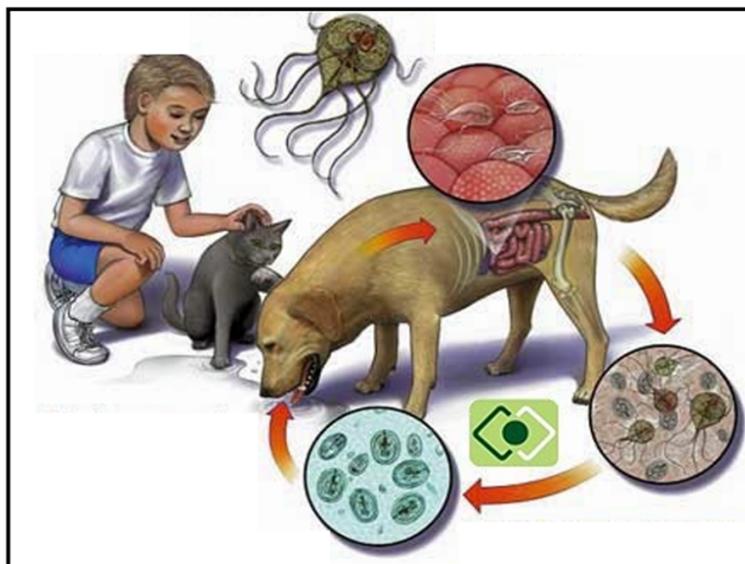


Figura 4. *Giardia* sp. Demonstração das estruturas parasitárias e o ciclo do parasito. FONTE: autor.

Giardia sp. é um organismo eucariótico unicelular, com um ciclo de vida direto. Seus mecanismos de adaptação e sobrevivência permitem uma infecção bem-sucedida por trofozoítos em uma ampla espectro de hospedeiros (humanos e animais), enquanto os cistos permitir a sobrevivência e a distribuição deste parasita no ambiente (ANKARKLEV et al. 2010). Existem 2 estágios de *Giardia* sp. em seu ciclo de vida, o trofozoíto e cisto. O trofozoíto em forma de lágrima é a forma ativa e móvel encontrada no trato intestinal. Tem aproximadamente 15 m de comprimento e

8 m de largura. O cisto de forma elipsoidal é o estágio ambientalmente resistente principalmente responsável pela transmissão; tem aproximadamente 12 metros comprimento e 7 m de largura. Trofozoítos podem ser encontrados nas fezes de cães ou gatos com diarréia, mas raramente sobrevivem por um período significativo período fora do hospedeiro. Em contraste, os cistos são muito resistentes e podem sobreviver vários meses fora do hospedeiro em condições úmidas e frias, mas são suscetíveis à dessecção em condições secas e quentes (TANGTRONGSUP et al., 2010).

As infecções por *Giardia* sp. podem resultar em sintomas em alguns indivíduos, mas a giardíase pode ser assintomática em outros (EINARSSON et al., 2016). Infecções intestinais agudas e crônicas em humanos assim como em animais domésticos são frequentemente causadas por este parasito (CERTAD et al., 2017). Embora esta infecção possa ter impactos profundos no o sistema gastrointestinal, as consequências extraintestinais e de longo prazo das infecções por *Giardia* em humanos também foram caracterizadas (HALLIEZ e BURET, 2013).

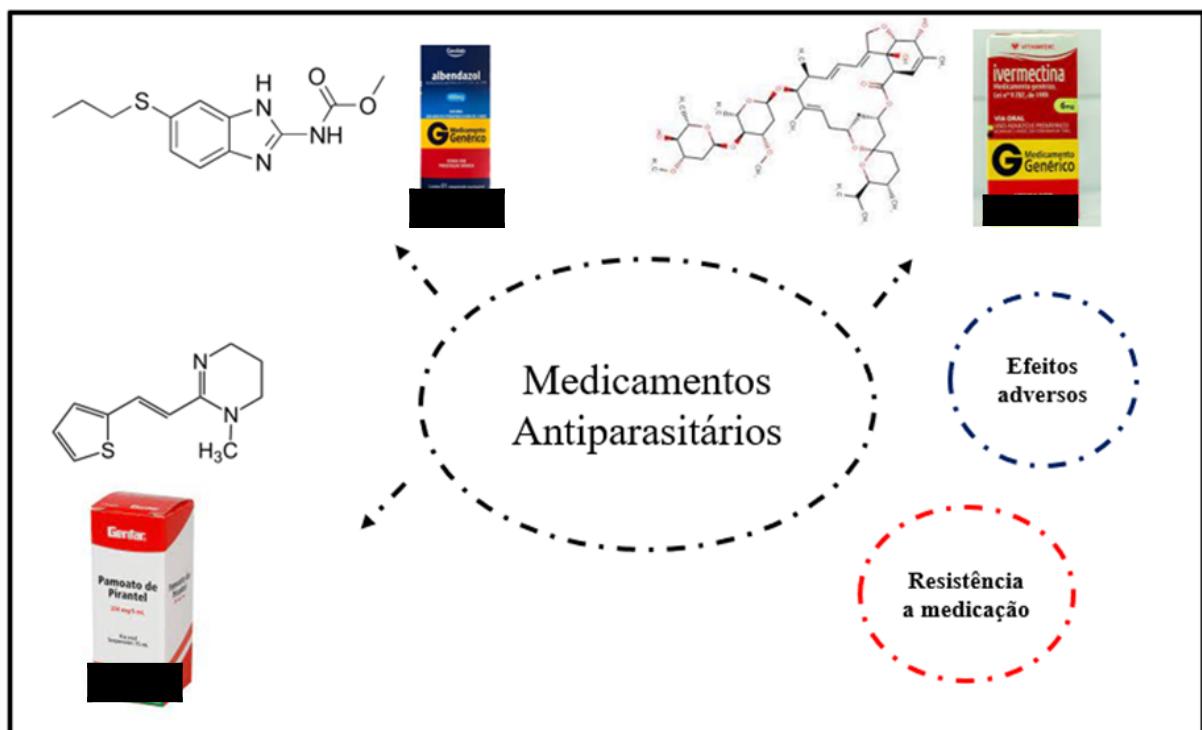
Os sinais clínicos na infecção por *Giardia* sp. variam de desconforto abdominal subclínico a dor abdominal intensa e cólicas. Quando o ocorre diarréia, é mole a aguado, freqüentemente tem muco na superfície, pode ter um odor forte e esteatorréia pode estar presente (BARR, 2006) A maioria dos cães e gatos infectados são afebris. O a diarreia é geralmente autolimitada em animais imunocompetentes. A má absorção crônica ocorre em alguns animais e, portanto, perda de peso pode ser detectada. Ao exame físico, o intestino delgado pode estar ligeiramente engrossado e o animal pode parecer imprudente. A gravidade da doença pode estar relacionada com a interação de fatores hospedeiros e de cepa. A presença de doenças imunossupressoras ou coinfeções também pode potencializar o desenvolvimento de sinais clínicos da doença (VASIOPULOS et al., 2006).

Nos países em desenvolvimento, onde os recursos de saúde são limitados, cerca de 200 milhões de pessoas têm sintomas de giardíase, com metade milhões de novos casos por ano (RIVERO et al., 2020). A *Giardia* sp. foi incluída na “Iniciativa para Doenças Negligenciadas” da OMS em 2004 (SAVIOLI et al., 2006) por suas significativas implicações socioeconômicas e de saúde pública. Seu potencial zoonótico é constantemente atualizado na saúde humana e veterinária (EINARSSON et al., 2016).

3.3. Tratamento convencional para as parasitoses.

As evidências atuais sugerem que a pesquisa em parasitologia veterinária está em declínio, apesar de sua importância (COLES et al., 2001). O interesse pela parasitologia veterinária deve-se, pelo menos em parte, ao sucesso das principais empresas na produção de uma gama de medicamentos antiparasitários eficazes e seguros. A pesquisa é necessária devido aos efeitos dos parasitas no bem-estar animal e aos custos econômicos dos parasitas. No entanto, há pouca informação sobre os custos reais dos parasitas animais. Outra razão importante para a pesquisa é o desenvolvimento de resistência a drogas em protozoários, helmintos de importância veterinária (COLES et al., 2001).

A abordagem das parasitoses intestinais, de uma maneira geral, consiste além do emprego de antiparasitários (Figura 5), em medidas de educação preventiva e de saneamento básico. Em vista da dificuldade de diagnóstico específico das parasitoses, muitas vezes são realizados tratamentos empíricos com mais de uma



droga. O tratamento das protozooses intestinais (giardíase e amebíase) tem sido

feito com os derivados nitroimidazólicos: metronidazol, tinidazol ou secnidazol (GARDNER; HILL, 2001)

Figura 5. Medicamentos antiparasitários.

As principais drogas usadas no tratamento dos nematódeos intestinais (como anciostomídeos, e *Toxocara* spp. são: mebendazol e albendazol. (GEERTS; GRYSEELS, 2000). Esses medicamentos são derivados benzimidazólicos de amplo espectro com pouca absorção. Tem atividade ovicida, porém não é larvicida (mebendazol), em contrapartida o albendazol possui ação vermicida, larvicida e ovicida. Geralmente os mesmos tem poucos efeitos colaterais, tais como: dor abdominal, náuseas, vômitos, diarréia, constipação (NEVES, 2005).

No tratamento da estrongiloidíase, o anti-parasitário mais eficaz é a ivermectina. Sendo muito utilizada na medicina veterinária. Os efeitos colaterais são leves: diarréia, anorexia e prurido (NEVES, 2005). Já na teníase, as drogas mais recomendadas são o praziquantel, pirantel e febantel, apresentando efeitos colaterais leves como mal estar, anorexia, vômito, dor abdominal (NEVES, 2005).

Os anti-parasitários são a terceira classe de medicamentos mais utilizada pelos tutores de pets, ficando atrás apenas dos antiinflamatórios e dos antibióticos no mundo. Entretanto, no estudo realizado por Buchini et al. (2020), essa classe de medicamentos foi a mais comercializada sem prescrição médica pelos estabelecimentos veterinários no Brasil (AMORIN et al., 2020).

O tratamento de animais parasitados pode ser desafiador por causa de regimes longos e resistência a medicamentos (RYAN e ZAHEDI, 2019). Além disso, falhas terapêuticas no mesmo estão relacionadas a reinfecção, a baixa adesão que envolve alto custo, dificuldade na administração, e um elevado número de efeitos colaterais (ROMANO et al., 2023). Porém, nos últimos anos alguns produtos antiparasitários que estão presentes no mercado possuem um efeito benéfico em virtude da capacidade da manutenção de níveis sanguíneos, o que acabaria por eliminar a dificuldade expressa pela necessidade de repetidas aplicações e risco de desenvolvimento de resistência (ADAMS et al., 2016). Dentre estes pode-se citar a NTZ (MORON-SOTO et al., 2017).

3.5. Nitazoxanida (NTZ)

A NTZ é uma droga relativamente nova que foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) em 2014 para o tratamento da giardíase em humanos, possui estrutura de um derivado nitrotiazólico (uma nitrotiazolil-salicilamida), cuja estrutura química é a 2-acetoliloxi-N-5-nitro-2-tiazolilbenzamida (Figura 6) (DI SANTO et al., 2014). A NTZ primeiramente apresentou efeito cestocida para o tratamento em humanos (ROSSIGNOL; MAISONNEUVE, 1984), já em 1994, foi descoberta a sua atividade contra protozoários (ROSSIGNOL et al., 2001).

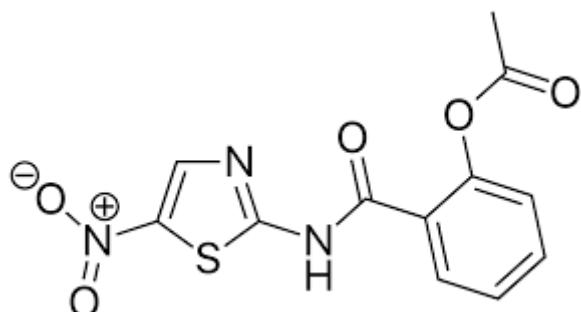


Figura 6. Molécula da nitazoxanida (NTZ)

Nos últimos anos houveram muitos estudos avaliando a atividade da NTZ contra um largo espectro de protozoários e helmintos que infectam o trato gastrointestinal do homem. Sendo eficaz contra *Trichomonas* spp., *Entamoeba histolytica*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Helicobacter pylori* e *Campylobacter jejuni* (DI SANTO et al., 2014).

O mecanismo de ação da NTZ se dá através da inibição de uma enzima protéica, a piruvato ferrodoxina oxidoredutase (PFOR), importante para o metabolismo energético destes parasitos. A NTZ interage diretamente com a PFOR, independentemente da ferrodoxina reduzida, não induzindo mutações no DNA. Este mecanismo de ação específico é importante na eficácia terapêutica da mesma, ainda, após a absorção, liga-se às proteínas plasmáticas, tendo uma meia-vida de 1 hora após a ingestão, sendo sua eliminação fecal, urinária e biliar (PIMENTEL et al., 2011).

Efeitos adversos descritos no homem foram de natureza leve, incluem náusea, vômito, dor abdominal e alteração da coloração urinária e espermática – esta última sem qualquer impacto clínico. Ainda, foi demonstrado que a NTZ tem uma eficácia para eliminar Giardia quando comparado ao metronidazol, mas tem menos efeitos adversos (MORON-SOTO et al., 2017). Para o melhor de nosso

conhecimento, não há muitos estudos sobre o efeito de NTZ contra infecções clínicas de Giardia em animais de companhia.

4. Artigos

4.1. Artigo 1

Avaliação da atividade e toxicidade in vitro da nitazoxanida (NTZ) isolada e associada frente a diferentes parasitos: um estudo prévio de uma alternativa terapêutica no tratamento de parasitoses em animais de companhia

Bruno Cabral Chagas, Rodrigo de Almeida Vaucher, Márcia Oliveira Nobre.

O artigo será submetido a revista **Ciência Animal Brasileira**

Avaliação da atividade e toxicidade *in vitro* da nitazoxanida (NTZ) isolada e associada frente a diferentes parasitos: um estudo prévio de uma alternativa terapêutica no tratamento de parasitoses em animais de companhia.

Bruno Cabral Chagas^a, Fabiane Grecco^a, Leandro Quintana Nizoli ^a, Rodrigo de Almeida Vaucher^b, Márcia Oliveira Nobre^a.

^a Programa de Pós-graduação em Veterinária, Grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Clínica de pequenos animais (CLINPet), ^bPrograma de pós graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brasil.

*** Address for correspondence**

Bruno Cabral Chagas – e-mail: brunocabral.chagas@gmail.com

Márcia de Oliveira Nobre – e-mail: marciaonobre@gmail.com

Programa de Pós-graduação em Veterinária, PPGVET, UFPel, Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brasil; E-mail: Phone: 55-53-32757233

ABSTRACT

Nitazoxanide (NTZ), widely used in humans, has a beneficial effect on the control of different parasites in animals. The present study aims to investigate the antiparasitic potential and toxicity of NTZ *in vitro* isolated and in association with pyrantel, febantel, praziquantel and ivermectin. In evaluating the *in vitro* efficacy of NTZ alone and in combination against *Ancylostoma* sp. and *Giardia* sp. the modified filtering and egg retrieval test was used. The cellular toxicity of NTZ alone and in combination against CRIB and MDCK cells was evaluated by analysis of cell tapetal destruction, in addition to hemotoxicity by analysis of hemolysis in canine, feline and equine blood. The effectiveness of NTZ on *Giardia* sp. isolated was 92%, in association it reached approximately 97%. Isolated NTZ was effective against eggs of *Ancylostoma* sp. in values of 48%, and associations increased its action potential by up to 81%. The best results were obtained with associations with pyrantel, febantel, and praziquantel, with variations in NTZ concentrations, with 30, 25, and 15%. At concentrations above 1mg/mL, nitazoxanide inflicted cellular damage above 58%, at a concentration of 10mg, it presented hemolysis in dogs and cats. NTZ has shown great potential for effectiveness against helminths and protozoa, low cellular toxicity, so its use for the treatment of parasites in domestic animals is promising, however further studies are needed to evaluate the potential of NTZ in animal models.

Keywords: Dogs; antiparasitic efficacy; vermifuge; cytotoxicity; hemotoxicity; *in vivo* test.

RESUMO

A nitazoxanida (NTZ), amplamente usada em humanos possui um efeito benéfico frente a ao controle de diferentes parasitos em animais. O presente estudo tem como objetivo investigar o potencial antiparasitário e a toxicidade da NTZ *in vitro* isolada e em associação com pirantel, febantel praziquantel e ivermectina. Na avaliação de eficácia *in vitro* da NTZ isolada e em associação frente a *Ancylostoma* sp. e *Giardia* sp. foi utilizado o teste modificado de filtragem e recuperação de ovos. Foi avaliada a toxicidade celular da NTZ isolada e em associação contra células CRIB e MDCK pela análise de destruição do tapete celular, além da hemotoxicidade pela análise de hemólise em sangue, canino, felino e equino. A eficácia da NTZ sobre *Giardia* sp. isolada foi 92%, em associação alcançou aproximadamente 97%. Isolada a NTZ foi eficaz contra ovos de *Ancylostoma* sp. em valores de 48%, sendo que associações aumentaram seu potencial de ação em até 81%. Os melhores resultados foram obtidos com as associações com pirantel, febantel, e praziquantel, com variações das concentrações de NTZ, com 30, 25 e 15%. Nas concentrações acima de 1mg/mL a NTZ infringiu dano celular acima de 58%, na concentração de 10mg, apresentou hemólise em cães e felinos. A NTZ demonstrou um grande potencial de eficácia contra helmintos e protozoários, baixa toxicidade celular, sendo assim o uso da mesma para o tratamento das parasitoses em animais domésticos se mostra promissor, no entanto faz-se necessário mais estudos para avaliação do potencial da NTZ em modelos animais.

Palavras -chave: Cães; eficácia antiparasitária; vermífugo; citotoxicidade; hemotoxicidade; teste *in vivo*.

1. INTRODUÇÃO

As parasitoses em animais de companhia são uma preocupação crescente na medicina veterinária pelo seu potencial patogênico e pela atual expansão em toda o mundo (1). Desta maneira o parasitismo gastrointestinal por helmintos como *Toxocara* sp., *Ancylostoma* sp, dentre outros e protozoários como *Giardia* sp. oferecem riscos à saúde animal e humana devido às alterações clínicas e transmissão de agentes potencialmente zoonóticos (2).

A ocorrência de parasitas gastrointestinais é variável e depende de muitos fatores, como idade, condições de vida, estado de saúde do animal, técnicas de diagnóstico utilizadas e região estudada (3). Essas doenças prejudicam o desenvolvimento do animal, e os sinais clínicos manifestam-se como diarreia, vômitos, perda de peso, obstrução intestinal parcial ou total, anemia, anorexia, ascite, que variam de acordo com a espécie e número de parasitas (4). Especificamente os quadros de giardíase em animais de companhia tem crescido nos últimos anos (5), sobre a epidemiologia relacionadas a infecções por *Giardia* sp. em animais de companhia, uma meta-análise mundial incluindo 127 publicações científicas e 4.309.451 animais revelou uma prevalência de 15,2% (6). Além disso, os animais domésticos foram associados à transmissão direta para humanos, particularmente em casos endêmicos, tornando-se um problema de saúde pública (6).

Pelos aspectos acima, o tratamento de animais parasitados pode ser desafiador por causa de regimes longos e resistência a medicamentos (7). Além disso, falhas terapêuticas no mesmo estão relacionadas a reinfecção, a baixa adesão que envolve alto custo, dificuldade na administração, e um elevado número de efeitos colaterais (8). Porém, nos últimos anos alguns produtos antiparasitários que estão presentes no mercado possuem um efeito benéfico em virtude da capacidade da manutenção de níveis sanguíneos, o que acabaria por eliminar a dificuldade expressa pela necessidade de repetidas aplicações e risco de desenvolvimento de resistência (9). Dentre estes pode-se citar a nitazoxanida (NTZ) (10).

A NTZ é uma benzamida sintética amplamente utilizada no tratamento da giardíase humana, inclusive em crianças. A atividade antiprotozoária da NTZ envolve o comprometimento do metabolismo energético em patógenos anaeróbicos pela inibição do piruvato: ferredoxina/flavodoxina oxidoredutase (PFOR) (10). Já frente a helmintos, a NTZ inibe a polimerização da tubulina que por conseguinte, atravanca a capacidade de replicação e motilidade do DNA de nematódeos. Isso causa a imobilização dos parasitos por ações destrutivas das células do intestino e tegumentares dos mesmos (11).

A NTZ é uma droga relativamente nova que foi aprovada pelo Food and Drug Administration (FDA) em 2014 para o tratamento da giardíase em humanos. Sendo também eficaz contra *Trichomonas* spp., *Entamoeba histolytica*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Helicobacter pylori* e *Campylobacter jejuni* (12). Nesse sentido, não há estudos sobre o efeito da NTZ isolada e em associação com pirantel, febantel praziquantel e ivermectina frente a capacidade de controle de parasitos gastrointestinais de cães e gatos como protozoários, nematódeos e cestódeos. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo investigar o potencial e adaptação da molécula NTZ “*in vitro*” isolada e em associação com pirantel, febantel praziquantel e ivermectina como antiparasitário, protozoaricida, nematodicida, além avaliar a sua toxicidade “*in vitro*” como estudo inicial para que no futuro a mesma possa ser uma possibilidade para o tratamento de parasitoses de animais de companhia.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Avaliação *in vitro* da eficácia antiparasitária sobre *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp. e cistos de *Giardia* sp.

Para avaliação da eficácia “*in vitro*” foi utilizado o teste modificado de filtragem e recuperação de ovos segundo (13). Para a técnica, foram utilizadas amostras coprológicas infestadas das quais obteve-se alíquotas filtradas e purificadas de 30 a 50 ooscistos de *Giardia* sp, 100 ovos de *Ancylostoma* sp. e 300 ovos de *Toxocara* sp/µL, quantificadas através da técnica de Mini Flotac®. O teste foi realizado com a molécula NTZ em diversas concentrações variando de 30 mg/Kg a 150 mg/ kg (Tabela 1) isolada ou em associações com ivermectina (0,2, pirantel e febantel e praziquantel. Como controle positivo foi utilizado um antihelmíntico reconhecido por sua eficácia e de largo uso no mercado veterinário composto por pirantel, febantel, praziquantel e ivermectina. Após 24h e 48h foi realizada a contagem ovos, oocistos e larvas de primeiro estágio (L1) para obtenção da estimativa de eclodibilidade dos ovos bem como de eficácia dos produtos testados. Para obtenção da porcentagem de eficácia realizou-se o cálculo a seguir: PERCENTUAL DE EFICÁCIA(%):
$$(L1/(ovos+L1)) \times 100.$$

2.2. Avaliação da toxicidade

Foram utilizadas células renais da linhagem MDRC e linhagem CRIB, (a qual é uma mutação da célula MDRC. A variação das linhagens do projeto inicial deu-se em razão da especificidade das células. As células foram incubadas em placas de 96 poços, em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 24h. Ao fim deste período, os meios foram aspirados e adicionados as concentrações seriadas de NTZ de 100 mg/ml, 10mg/ml, 1mg/mL, 0,1 mg/ml. Após, as placas foram acondicionadas novamente em estufa a 37 °C e 5% CO₂ por 24 h. Ao término das 24 horas, os tratamentos de cada poço foram aspirados e 100 µL de solução de brometo de [3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MMT) foram adicionados individualmente por poço com posterior incubação de 4 horas. Foi então realizada a análise de absorbância das células em espectofotômetro de placas. Foi procedida a leitura e a viabilidade celular calculada pela fórmula: média da absorbância dos tratados/ média dos controles x100. A análise dos resultados foi realizada pela porcentagem obtida, tendo como média de comparação dos resultados obtidos com o controle em contrapartida aos tratamentos.

2.3. Avaliação da hemotoxicidade

Foi realizado o teste de hemólise como um dos parâmetros pré-clínicos. Para realização do teste de hemólise, foram coletadas amostras individuais de sangue venoso das espécies alvo, cães e gatos e também de cavalo utilizando tubos com anticoagulante E.D.T.A respeitando o volume máximo de 4 mL do tubo. Para obtenção de uma maior quantidade de amostras, o sangue foi avaliado quanto as suas condições e ausência de agregação plaquetária, sendo então realizado uma homogeneização das amostras. O sangue foi centrifugado a 2500 rpm por 10 minutos para o preparo do concentrado de hemácias. Posteriormente a retirada do plasma, o concentrado de hemácias foi diluído em uma solução a 4 % (4% de concentrado de hemácias e 96 % de solução tampão fosfato salino com pH de 7,2). (1 mL do infranadante em 99 mL de tampão fosfato com pH 7,2). Desta solução foram utilizados 450 µL em tubos de 5 mL e mais 50 µL dos produtos à base de NTZ, pirantel, febantel, praziquantel e ivermectina, (concentração de 1 mg/mL), Triton X-100 (controle negativo) e uma solução detergente como controle positivo. Foram utilizadas três concentrações dos produtos testes, 35% (0,35/1), 100% (1/1) e 200% (2/1), sendo todos os testes realizados em triplicata.

Os tubos foram incubados a 37°C por 30 minutos e centrifugados a 3000 rpm por 10 minutos. A leitura do sobrenadante foi realizada em leitor de microplacas (Thermo plate/ TP-READER) a 650 nm, no qual foi avaliado a dispersão de hemácias no sobrenadante

por absorbância sendo considerado absorbância 0 um valor sem presença de hemólise e qualquer valor acima de 0 presença de hemólise. O cálculo de avaliação de hemólise levou em conta os valores máximos de hemólise apresentados, ou seja, os dados do controle positivo em detrimento aos valores apresentados com o uso dos compostos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Testes *in vitro* de eficácia da NTZ isolada e em associação

Os resultados de eficácia de compostos antiparasitários sob a eclodibilidade dos ovos a partir da contagem de todas as estruturas (ovos, oocistos e larvas de primeiro estágio – L1) do parasito *Ancylostoma* sp. *in vitro*, demonstraram uma alta eficácia de controle antiparasitário dos compostos utilizados. Pode-se notar a eficácia do composto e adaptação do mesmo quanto a variação de concentrações testadas no controle do parasita *Ancylostoma* sp (Tabela 1), visto que a partir dos testes realizados com concentrações maiores e utilização de associações, conseguiu-se potencializar o uso da mesma tanto isolada com utilizada em associação (Tabela 2).

Tabela 1: Eficácia antiparasitária da NTZ isolada e associada com ivermectina, febantel, pirantel e praziquantel na redução da viabilidade dos ovos do parasito *Ancylostoma* *in vitro*.

Antiparasitários (mg/kg)	Redução de ovos (%)
Controle negativo	12
NTZ (100)	89
NTZ+ivermectina (100; 0,2)	92
NTZ+febantel (100; 25)	90
NTZ+febantel (72; 25)	90
NTZ+pirantel (100, 5)	86
NTZ+pirantel+febantel (100; 5; 15)	95
NTZ+pirantel+febantel (75; 5; 15)	90
NTZ+pirantel+febantel+praziquantel (75; 5; 15; 5)	95
NTZ+pirantel+febantel+praziquantel (37,5; 5; 15; 5)	94
NTZ+pirantel+febantel+praziquantel (25; 5; 15; 5)	89

Os dados encontrados (Tabela 1), revelaram que a NTZ isolada foi eficaz contra ovos de *Ancylostoma* sp. em valores de até 95%. Por possuir amplo espectro e graças à tecnologia empregada na sua estruturação, possui baixa capacidade de desenvolvimento de resistência em parasitos um fator que corrobora com sua utilização em animais (14, 15), sendo que contra

helmintos, a NTZ inibe a polimerização da tubulina que por conseguinte, interrompe a replicação e motilidade do DNA de nematódeos, causando a imobilização dos parasitos (16). Algumas associações, como o caso da ivermectina na concentração de 0,2 mg/mL, potencializaram em até 3% o seu nível de ação, sendo que as associações da NTZ, aumentaram seu potencial de ação consideravelmente, variando em até 6% a sua capacidade de redução de ovos de *Ancylostoma* sp sendo que acerca do parasito *Toxocara* sp, pode-se notar a ação do composto em até 100% de eficácia. Em virtude de sua capacidade de manutenção de níveis no organismo, traz um enorme benefício pela diminuição da obrigatoriedade de repetição de aplicação do produto tal como é realizado com outros compostos (17). Este fator é de extrema importância quando se realiza tratamento para giardíase a qual tem alta prevalência em cães e gatos domésticos. A extensa ação apresentada pela NTZ no uso frente a *Ancylostoma*, também foi notada em replicação do seu teste como protozoaricida, visto que na tabela 2 está demonstrada a eficácia de ação do produto sobre cistos de *Giardia* sp, seja isolada ou associada a outros antiparasitários.

Tabela 2- Demonstração dos dados de eficácia da nitazoxanida (NTZ) isolada e em associação com pirantel, febantel, praziquantel e pirantel.

Antiparasitários (mg/mL)	Índice de redução de ovos e cistos (%)		
	<i>Ancylostoma</i> sp	<i>Toxocara</i> sp	<i>Giardia</i> sp
NTZ (10)	77	83	92
pirantel+febantel+praziquantel+ivermectina (10 ;5;15;5; 0,2)	89	90	81
NTZ+pirantel+febantel+praziquantel+ivermectina (10 ;5;15;5; 0,2)	100	100	100

Os resultados expostos de eficácia da NTZ sobre *Giardia* sp., demonstram o grande potencial de resposta ao parasito, visto que a média de eficácia do produto isolado foi 92% já em associação a média de eficácia alcançou aproximadamente 97% (Tabela 2), ou seja, corroborando com autores que encontraram determinaram eficácia *in vitro* da NTZ (18, 19).

Antiparasitários a base de NTZ para uso veterinário não estão disponíveis no mercado brasileiro, embora já sejam utilizados para humanos (18). Estes dados demonstram a importância da utilização da NTZ em associação com outros antiparasitários e seu potencial simbiótico com drogas já existentes no mercado. Poder realizar testes de eficácia e toxicidade

para incorporar este ao leque de produtos disponíveis para o mercado pet brasileiro é de extrema importância por todos os benefícios que a mesma permeia.

3.2. Avaliação da toxicidade da molécula NTZ in vitro: citotoxicidade sobre linhagem celular Mardin-Darby de rim canino (MDRC) e CRIB.

Os dados apresentados (Tabela 3) indicam que a molécula NTZ, testada nas concentrações de 100mg/mL, 10mg/mL e 0,1 mg/mL apresentaram maiores graus de toxicidade renal quando em comparação aos controles celulares. O antiparasitário apresentou diminuição da capacidade de destruição do tapete celular quando da diminuição da dose em comparação a concentração inicial de 100 mg/mL.

É importante pontuar que a NTZ, pós ingestão é metabolizada e hidrolisada em alguns metabólitos ativos como a tizoxanida e a tizoxanida glucoronida, as quais via urina são excretadas pelo rim e que em doses altas comprometem o funcionamento do mesmo em virtude de permanecerem ainda 99% ligadas ao plasma (20). Levando em conta esse dado, é de notável expressão que o composto que entrará em contato com as células renais são os metabólitos da NTZ e não ela diretamente o que pode ter alterado a capacidade de manutenção de sua segurança frente a esse teste. Em protocolos utilizando uma dosagem de 7,5 mg/kg de NTZ durante 3 dias consecutivos em cães, não foram demonstradas alterações a nível sérico nos parâmetros de uréia e creatinina (21), sendo que o resultado demonstrado neste trabalho, é relativo as dosagens exacerbadas do produto (Tabela 3).

Por mais que a molécula NTZ tenha eficácia e segurança comprovada no controle de protozoários e parasitos, em concentrações maiores, sua utilização demonstrou alta toxicidade celular tanto sobre células renais da linhagem CRIB (Figura 1) quanto sobre células renais linhagem MDCK diferindo muito do controle (Figura 2).

Tabela 3. Viabilidade de células Mardin-Darby de rim canino (MDCK) e de células (CRIB) submetidas ao tratamento com diferentes diluições de NTZ (NTZ)

Antiparasitários (mg/mL)	Redução da Viabilidade Celular (%)
Células CRIB	
Controle de células	-
NTZ (100)	97
NTZ (10)	94
NTZ (1)	59
NTZ (0,1)	59
NTZ (0,01)	25
NTZ (0,001)	13
NTZ (0,0001)	7
NTZ (0,00001)3	7
NTZ (0,000001)	0

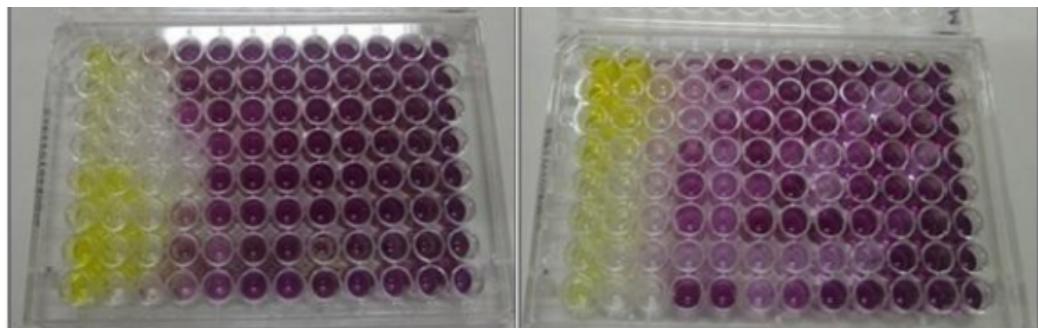


Figura 1. Placa corada com MTT em teste de toxicidade da molécula NTZ nas várias concentrações demonstrando alta viabilidade celular nos poços de coloração roxa e morte celular nos poços de coloração amarelada. Nas células renais linhagem CRIB (esquerda) e sobre células renais linhagem MDCK (Direita).



Figura 2. Célula MDCK submetida a concentração de 100 mg/mL de NTZ (Esquerda) com intensa degradação tecidual do tapete celular e ontrole celular (Direita) demonstrando tapete celular íntegro.

3.2. Avaliação da hemotoxicidade da molécula NTZ isolada e associada.

Os valores expressos através da absorbância, são expressos pela quantidade de luz que consegue atravessar a amostra. Sendo assim, na tabela 6, podemos notar que nas concentrações de 200%, nenhuma amostra sanguínea testada de cães e gatos além do controle negativo conseguiu apresentar valores menores que 1, 1 de absorbância, demonstrando potencial quantidade de hemólise enquanto em equinos, demonstrou-se valores menores de 0,2 de absorbância. Na concentração de 100% o produto composto por NTZ, pirantel, praziquantel, febantel e ivermectina, em cães teve um grande valor de absorbância encontrado sendo ainda maior em gatos. Já em equinos a realidade encontrada é outra, pois os valores de absorbância não alcançam 0,5% demonstrando que a espécie equina foi a menos afetada com a ação hemolítica do produto.

Tabela 4. Valores médios de absorbância de concentrado de hemácias de cães, felinos e equinos submetidos a teste de hemólise com NTZ (NTZ), pirantel, praziquantel, febantel e ivermectina 10; 5; 15; 5; 0,2 mg/mL respectivamente), controle negativo e controle positivo, todos nas concentrações de 200%, 100% e 35%.

Produtos/ Espécies testadas	Caninos			Felinos			Equinos		
	Concentrações								
	200%	100%	35%	200%	100%	35%	200%	100%	35%
NTZ,pirantel,praziquantel	1,447	1,65	0,2	1,9	1,78	1,03	0,136	0,345	0,1
febantel+ivermectina									
NTZ,pirantel, praziquantel, Febantel	1,204	0,8	0,2	1,79	1,69	1,55	0,119	0,121	0,8
NTZ	1,5	0,9	0,22	1,74	0,95	0,87	0,152	0,209	0,02
NTZ+piran+praziq+febantel	1,1	1,17	0,62	1,66	1,45	1	0,124	0,109	0,06
Controle negativo	0,05	0,044	0,02	0,066	0,059	0,04	0,02	0,001	0,00
						5			1
Controle positivo	1,61	1,69	1,81	2,06	1,98	1,7	1,13	0,9	0,13
									5

Sobre os valores de porcentagens de hemólise o composto contendo NTZ, na concentração de 35% o composto contendo NTZ, pirantel, praziquantel, febantel e ivermectina, alcançou um valor de 61% de hemólise em felinos, já em cães somente 11% e nos equinos 74%, conforme demonstrado na Figura 3. Pode-se observar na Figura 4 que os valores de hemólise entre espécies foi bem variado, visto que a NTZ isolada teve valor similar entre equinos e cães (15 e 12% respectivamente).

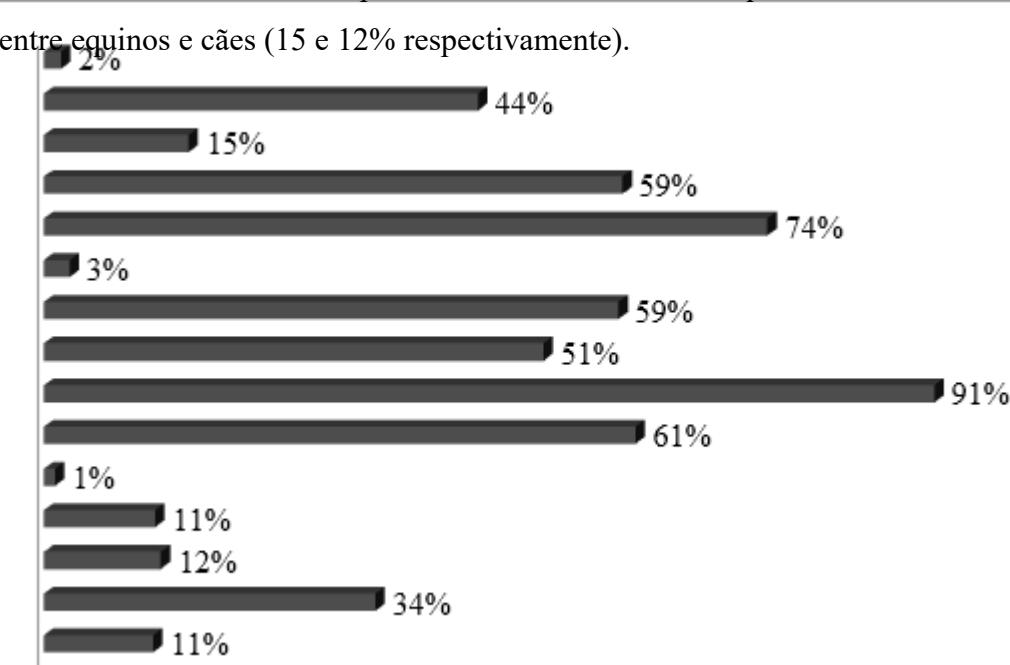


Figura 3. Efeito hemolítico sob hemácias de cães, felinos e equinos dos compostos a base de nitazoxanida (Nita. ou Nit), pirantel (pir. ou piran.), praziquantel (praziq. ou praz.), febantel (feb.) e ivermectina (iverm.) (10; 5; 15, 5; 02 mg/mL respectivamente), controle negativo (ctrl -) na concentração de 35%.

Aumentando o percentual das concentrações houve uma inversão de valores, pois o potencial de hemólise em equinos não foi maior que 38% enquanto em cães alcançou 98% e gatos alcançou até 90%. Na dosagem terapêutica, as espécies felina e canina alcançaram valores de hemólise maiores ou iguais a 90% em algumas concentrações e com uso da NTZ isolada. Vale salientar que quando o composto contendo NTZ, pirantel, praziquantel e febantel é comparado a um composto comercial contendo Pirantel, praziquantel, febantel e ivermectina, não observamos grande diferença de potencial de hemólise, sendo a maior observada na espécie equina com uma diferença de 26% (Figura 4).

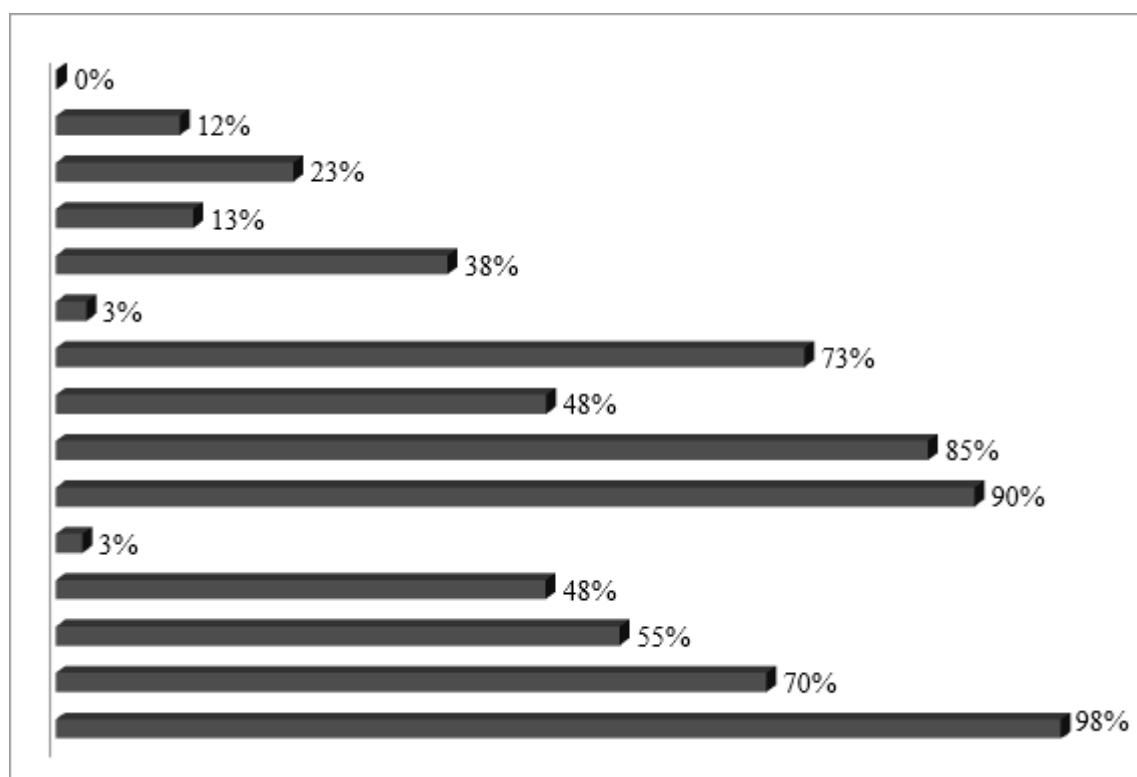


Figura 4. Efeito hemolítico sob hemácias de cães, felinos e equinos dos compostos a base de nitazoxanida (Nita. ou Nit), pirantel (pir. ou piran.), praziquantel (praziq. ou praz.), febantel (feb.) e ivermectina (iverm.) (10; 5; 15, 5; 02 mg/mL respectivamente), controle negativo na concentração de 100%.

A concentração, mas alta testada, sendo a dose terapêutica testada em dobro. Nesse gráfico, pode ser notada que na espécie equina e canina houve valores de hemólise menor que 80%, sendo que na espécie felina, os valores ultrapassaram os 90% de hemólise. Esse fato, acaba sendo um limitante frente ao uso da molécula isolada ou associada tanto em cães quanto em gatos, porém, na espécie felina em virtude de uma diminuída capacidade metabólica quando em comparação com cães, acentua-se o risco de potenciais intoxicações e anemias (Figura 5).

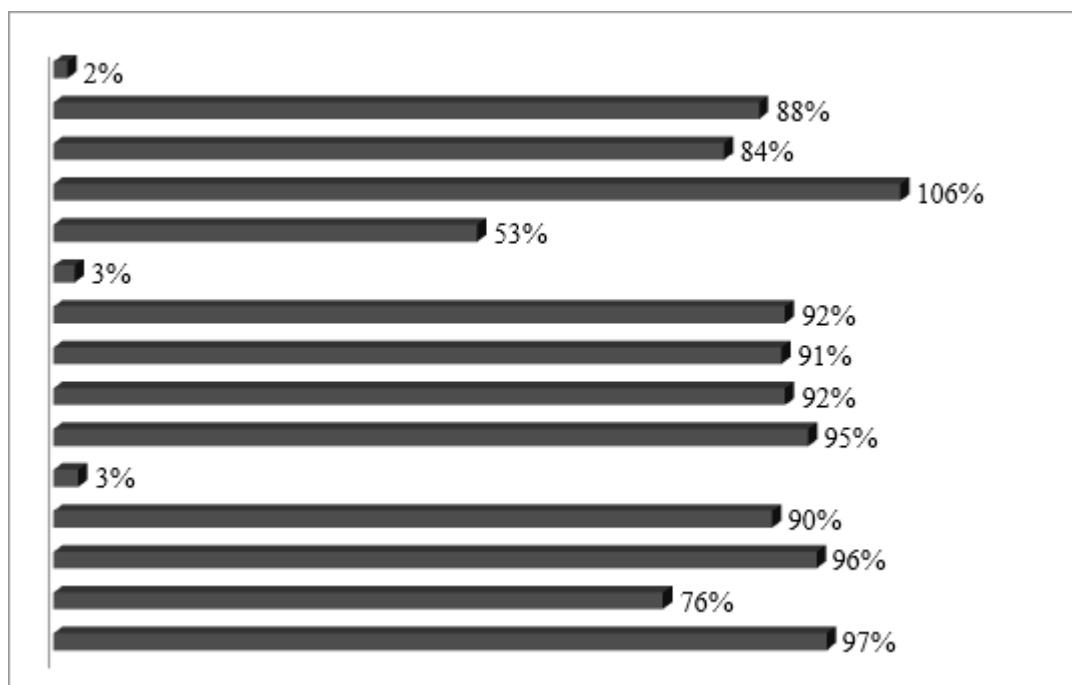


Figura 5. Efeito hemolítico sob hemácias de cães, felinos e equinos dos compostos a base de nitazoxanida (Nita. ou Nit), pirantel (pir. ou piran.), praziquantel (praziq. ou praz.), febantel (feb.) e ivermectina (iverm.) (10; 5; 15, 5; 02 mg/mL respectivamente), controle negativo na concentração de 200%.

A NTZ por ser uma molécula de baixa solubilidade e alta permeabilidade, é metabolizada a nível hepático e degradada a nível sérico em alguns conjugados como glucoronídeos e sulfônicos, porém sua maior eficácia é tida pelo seu metabólito ativo a tizoxanida, que se mantém ligada em 99% a proteínas plasmáticas, sendo ela a responsável pela eficácia antiparasitária (22). Visto isso, tal qual a nível renal, a NTZ não degradada, apresentou graus exacerbados de toxicidade a nível sanguíneo os quais são explicados pela falta de dissociação de sua molécula em compostos com peso molecular menor e menos reativos.

4. CONCLUSÕES

Nos testes *in vitro* realizados, a NTZ demonstrou um grande potencial de eficácia contra helmintos e protozoários. Sua inclinação como agente simbiótico com outros antiparasitários é extremamente notável, a ponto de ser considerado como um excelente parasiticida principal. Desta forma, como a NTZ apresentou elevada eficácia de resposta aos parasitos avaliados nos testes *in vitro* tanto isolada como em associação, e alguma toxicidade celular, sendo assim o uso da mesma se mostra promissor.

Em suma, a molécula de NTZ vem apresentando bons resultados de eficácia que devem ser explorados e abrangidos, bem como um estudo mais aprofundado referente a toxicidade da mesma. Sendo assim, faz-se necessário mais estudos para avaliação do potencial da NTZ em modelos animais, para que a mesma possa vir a ser uma alternativa no tratamento de parasitoses em animais de companhia.

5. Referências

1. Traversa D, Morelli S, Cassini R, Crisi PE, Russi I, Grillotti E, et al. Occurrence of canine and feline extra-intestinal nematodes in key endemic regions of Italy. *Acta tropica*. 2019;193:227-35.

2. Souza CTvd, Dorr AP, Silva VLdB, Silva FdL, Silva EBd, Ramos DGdS, et al. Occurrence of gastrointestinal parasites in dogs from Cuiabá, Mato Grosso. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2023;32.
3. Lara-Reyes E, Quijano-Hernández IA, Rodríguez-Vivas RI, Ángel-Caraza D, Martínez-Castañeda JS. Factores asociados con la presencia de endoparásitos y ectoparásitos en perros domiciliados de la zona metropolitana de Toluca, México. *Biomédica*. 2021;41(4):756-72.
4. Traversa D. Pet roundworms and hookworms: a continuing need for global worming. *Parasites & vectors*. 2012;5:1-19.
5. Hohweyer J, Cazeaux C, Travaille E, Languet E, Dumètre A, Aubert D, et al. Simultaneous detection of the protozoan parasites Toxoplasma, Cryptosporidium and Giardia in food matrices and their persistence on basil leaves. *Food microbiology*. 2016;57:36-44.
6. Bouzid M, Halai K, Jeffreys D, Hunter PR. The prevalence of Giardia infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Veterinary parasitology*. 2015;207(3-4):181-202.
7. Ryan U, Cacciò SM. Zoonotic potential of Giardia. *International journal for parasitology*. 2013;43(12-13):943-56.
8. Romano F, Lallo MA. Efficacy of a single dose of nitazoxanide in dogs naturally infected with Giardia duodenalis. *Research in Veterinary Science*. 2023;159:252-6.
9. Prichard RK, Geary TG. Perspectives on the utility of moxidectin for the control of parasitic nematodes in the face of developing anthelmintic resistance. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*. 2019;10:69-83.
10. Moron-Soto M, Gutierrez L, Sumano H, Tapia G, Alcalá-Canto Y. Efficacy of nitazoxanide to treat natural Giardia infections in dogs. *Parasites & vectors*. 2017;10(1):1-9.
11. Einarsson E, Ma'ayeh S, Svärd SG. An up-date on Giardia and giardiasis. *Current opinion in microbiology*. 2016;34:47-52.
12. Di Santo N, Ehrisman J. A functional perspective of nitazoxanide as a potential anticancer drug. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2014;768:16-21.

13. Minho A, Gaspar E, Yoshihara E. Manual de técnicas laboratoriais e de campo para a realização de ensaios experimentais em parasitologia veterinária: foco em helmintos gastrintestinais de ruminantes. 2015.
14. Fan L, Qiu X-x, Zhu Z-y, Lv J-l, Lu J, Mao F, et al. Nitazoxanide, an anti-parasitic drug, efficiently ameliorates learning and memory impairments in AD model mice. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2019;40(10):1279-91.
15. Shakya A, Bhat HR, Ghosh SK. Update on nitazoxanide: a multifunctional chemotherapeutic agent. *Current drug discovery technologies*. 2018;15(3):201-13.
16. Guerreiro F, Sodré C, Pavan L, Barroso P, Quintella D, Cuzzi T, et al. Disseminated strongyloidiasis. *Acta Dermatovenerologica Croatica*. 2018;26(4):333-.
17. Pal AK, Nandave M, Kaithwas G. Chemoprophylactic activity of nitazoxanide in experimental model of mammary gland carcinoma in rats. *3 Biotech*. 2020;10:1-12.
18. Matadamas-Martínez F, Nogueda-Torres B, Castillo R, Hernández-Campos A, Barrera-Valdes MdL, León-Ávila G, et al. Characterisation of the in vitro activity of a Nitazoxanide-N-methyl-1H-benzimidazole hybrid molecule against albendazole and nitazoxanide susceptible and resistant strains of *Giardia intestinalis* and its in vivo giardicidal activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2020;115.
19. Tsuji ÓV, Rivera TC, Macotela MP, Aldama MJF. Diarrhea caused by *Cryptosporidium* and nitazoxanide in immunocompromised patients. *Revista de Enfermedades Infecciosas en Pediatría*. 2011;24(96):132-3.
20. Broekhuysen J, Stockis A, Lins R, De Graeve J, Rossignol J. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2000;38(8):387-94.
21. Pimentel FF, de Almeida AJ, de Oliveira FCR, Ederli BB. Efeito do tratamento com nitazoxanida na criptosporidiose canina. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*. 2011;14(2).
22. Lira BSdMM, Sousa VCd, Brito FÍdS, Carvalho ALM. Nitazoxanide: general aspects, release systems and potential for repositioning the molecule. 2021.

4.2. Artigo 2

Eficácia e toxicidade da administração *in vivo* de nitazoxanida (NTZ) isolada e em associação com ivermectina, febantel, pirantel e praziquantel em modelo murino

Bruno Cabral Chagas; Fabiane Grecco, Marcelo de Lima, Márcia de Oliveira Nobre

O artigo será submetido a revista **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**.

**Efficacy and toxicity of in vivo administration of nitazoxanide (NTZ)
alone and in association with ivermectin, febantel, pyrantel and
praziquantel in a murine model.**

**Eficácia e toxicidade da administração in vivo de nitazoxanida (NTZ)
isolada e em associação com ivermectina, febantel, pirantel e
praziquantel em modelo murino.**

Bruno Cabral Chagas; Márcia de Oliveira Nobre

^a Programa de Pós-graduação em Veterinária, Grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Clínica de pequenos animais (CLINPet), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brasil.

*** Address for correspondence**

Bruno Cabral Chagas – e-mail: brunocabral.chagas@gmail.com

Márcia de Oliveira Nobre – e-mail: marciaonobre@gmail.com

Programa de Pós-graduação em Veterinária, PPGVET, UFPel, Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brasil; E-mail: Phone: 55-53-32757233

Abstract

Nitazoxanide (NTZ) is an antiparasitic with high potential for use and which has been demonstrating excellent isolated or associated efficacy against parasites and protozoa of dogs in *in vitro* tests. The objective of the study was to evaluate the efficacy and acute and chronic toxicity of NTZ alone and in association with commercial antiparasitic agents in a murine model. sp, and after confirmation of contamination they were treated with nitazoxanide, pyrantel, febantel, praziquantel and ivermectin. Toxicity was tested by treating the animals with the product at a therapeutic dose, under dose and over dose. The data expressed by the use of isolated NTZ in the control of *Giardia* sp, were very expressive, since they reached the level of 99%, followed by 98% for *Toxocara* sp and 86% against *Ancylostoma* sp. The toxicity tests, on the other hand, showed that only two animals in the over-dose group had altered liver enzyme values, suggesting that the product at the tested concentrations projects safety since it did not show toxicity. Due to exposure to NTZ associated with the antiparasitic drugs ivermectin, febantel, praziquantel and pyrantel, it is an effective compound in the control of *Giardia* sp., *Ancylostoma* sp and *Toxocara* sp. to become an alternative for the treatment of parasites, and may become one of the existing commercial antiparasitic products in the veterinary market.

Keywords: Antiparasitic, murine, nitazoxanide, parasites.

Resumo

A nitazoxanida (NTZ) é um antiparasitário com alto potencial de uso e que vem demonstrando ótima eficácia isolada ou associada contra parasitos e protozoários de cães em testes *in vitro*. O objetivo do estudo foi avaliar a eficácia e a toxicidade aguda e crônica da NTZ isolada e em associação com antiparasitários de uso comercial em modelo murino. Para avaliação da eficácia, os animais foram tratados com inóculos parasitários de *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp e *Giardia* sp, e pós confirmação da contaminação os mesmos foram tratados com NTZ, pirantel, febantel praziquantel e ivermectina. A toxicidade foi testada a partir do tratamento dos animais com o produto em dose terapêutica, subdose e sobredose. Os dados expressos pelo uso da NTZ isolada no controle da *Giardia* sp, foram muito expressivos, visto que alcançaram o patamar de 99%, seguidos de 98% para *Toxocara* sp e 86% contra *Ancylostoma* sp. Já os testes de toxicidade demonstraram que apenas 3% dos animais do grupo sobredose apresentaram valores de enzimas hepáticas alterados sugerindo que produto nas concentrações testadas demonstra segurança visto que o mesmo não apresentou toxicidade na dose terapêutica. Em virtude do exposto a NTZ associada aos antiparasitários ivermectina, febantel, praziquantel e pirantel, é um composto eficaz no controle de *Giardia* sp., *Ancylostoma* spp e *Toxocara* spp., bem como projeta uma segurança na sua utilização não apresentando toxicidade na dose terapêutica, sendo passível assim de tornar-se uma alternativa para o tratamento de parasitoses, podendo vir a se tornar um dos produtos comerciais antiparasitários existentes no mercado veterinário.

Palavras-chaves: Antiparasitário, murino, nitazoxanida, parasitoses.

1. Introdução

A nitazoxanida (NTZ) é um antiparasitário sintético com uma composição molecular, que lhe confere uma importante e ampla ação frente a agentes microbianos e a helmintos e devido a tecnologia empregada na sua estruturação, possui baixa capacidade de desenvolvimento de resistência pelos parasitos (Fox and Saravolatz 2005). Possui sua ação baseada no ataque do sistema energético dos parasitos, incidindo na capacidade de bloqueio da enzima piruvato ferrodoxina oxidoreductase (PFOR) sendo ainda importante a capacidade de não causar mutações no DNA do hospedeiro (Shakya, Bhat et al. 2018).

Possui uso expressivo nos Estados Unidos da América e no Brasil para tratamento de giardíases, criptosporídias e amebíases em humanos (Guerreiro, Sodré et al. 2018), porém, sem aprovação pelos órgãos competentes no Brasil para uso animal (Pimentel, de Almeida et al. 2011, Romano and Lallo 2023). As parasitoses causadas por protozoários e helmintos como *Giardia* sp, *Toxocara* sp. e *Ancylostoma* sp possuem grande apelo junto ao contexto da saúde pública visto que muitas são zoonoses de larga ascensão, alto potencial infeccioso, capacidade de manutenção no ambiente e alta prevalência registrada em todo o território nacional (Chagas, Motta et al. 2019, Ferraz, Evaristo et al. 2019, Mello, Nizoli et al. 2020).

O emprego da molécula de NTZ no tratamento antiparasitário de animais é de suma importância para a saúde pública, uma vez que os mesmos possuem um papel muito importante dentro do âmbito familiar (Krug, Schmitt et al. 2021). Poder inserir no mercado de produtos antiparasitários veterinários um medicamento com baixa capacidade de desenvolvimento de resistência, sobre o qual seja comprovada a segurança e praticidade do seu uso com um alto grau tecnológico nos seus testes e validações (Estrela, Vargas et al. 2023) é de suma importância no âmbito da saúde única, compostos pelo indivíduo, os animais e o meio ambiente.

Os testes de comprovação de eficácia antiparasitária e de análise de toxicidade *in vivo*, surgem como a etapa de comprovação da seguridade do produto, visto que é uma etapa que precede testes *in vitro* e *ex vivo* que embasam as análises a serem realizadas em modelo murino (Antiorio, Massironi et al. 2019).

Além disso, cabe a consideração de que mesmo que existam no mercado brasileiro antiparasitários similares e com eficácia inicialmente comprovada, os

mesmos se restringem a princípios ativos já conhecidos, com espectros de ação específicos/limitados e com necessidade de doses repetidas. Portanto, considerando o ineditismo do antiparasitário veterinário contendo NTZ, este estudo visa apresentar os efeitos da eficácia antiparasitária e toxicidade da NTZ isolada e em associação com outros antiparasitários em modelo murino.

2. Metodologia

2.1. Análise de eficácia frente aos parasitos *Toxocara* sp, *Ancylostoma* sp. e *Giardia* sp.

2.1.1. Animais estudados

Para avaliação de eficácia antiparasitária sobre o parasito *Toxocara* sp., foram utilizados 32 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss (25 a 35g de peso). Para avaliação da eficácia frente a *Giardia* sp 32 camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss (25 a 35g de peso) e para avaliar a eficácia frente a *Ancylostoma* sp foram utilizados 32 hamsters *Golden syrian* (100 a 150g de peso) (Número CEEUA 140/2021) o dia “0” do protocolo experimental todos os animais foram pesados e submetidos a coleta sanguínea e 24h após, foram infectados pelos inóculos parasitários através de gavagem intragástrica. Para avaliação da eficácia antiparasitária, foram estabelecidos 4 grupos experimentais por parasito estudado, *Toxocara* sp, *Giardia* sp e *Ancylostoma* sp (Tabela 1). Os animais foram novamente pesados para o cálculo e administração dos tratamentos propostos 15 após a infecção com *Toxocara* sp e *Giardia* sp e 21 dias para os infectados com *Ancylostoma* sp. No final do experimento os animais foram sedados com isoflurano para coleta de amostras sanguíneas intracardíacas e na sequência realizada a eutanásia e posteriormente ao óbito foi realizada necropsia com intuito de coleta amostras teciduais, para estudo histopatológico e pesquisa de presença de parasitas.

Tabela 1. Demonstração dos tratamentos utilizados para avaliação da eficácia em modelo murino contra *Toxocara* sp, *Giardia* sp e *Ancylostoma* sp.

Parasitas	Avaliação da eficácia in vivo em modelo murino	Animais N	
		Tratamentos	
<i>Toxocara</i> sp	G1- composto contendo NTZ (10mg/kg) + Pirantel (5 mg/kg)+febantel(15mg/kg)+ praziquantel (5mg/kg)+ivermectina (0,2mg/kg)	Camundongos	
	G2- NTZ (10mg/kg)	Camundongos	8
	G3-Pirantel (5mg/kg) + febantel (15mg/kg) + praziquantel (5mg/kg) + ivermectina (0,2mg/kg) – Controle positivo	Camundongos	8
	G4- Oleo de canola- Controle negativo	Camundongos	8
<i>Giardia</i> sp	G1- composto contendo NTZ (10mg/kg) + Pirantel (5 mg/kg)+febantel(15mg/kg)+praziquantel (5mg/kg)+ivermectina (0,2mg/kg)	Camundongos	
	G2- NTZ (10mg/kg)	Camundongos	8
	G3-Pirantel (5mg/kg) + febantel (15mg/kg) + praziquantel (5mg/kg) + ivermectina (0,2mg/kg) – Controle positivo	Camundongos	8
	G4- Oleo de canola- Controle negativo	Camundongos	8
<i>Ancylostoma</i> sp	G1- composto contendo NTZ (10mg/kg) + Pirantel (5 mg/kg)+febantel(15mg/kg)+praziquantel (5mg/kg)+ivermectina (0,2mg/kg)	Hamsters	
	G2- NTZ (10mg/kg)	Hamsters	8
	G3-Pirantel (5mg/kg) + febantel (15mg/kg) + praziquantel (5mg/kg) + ivermectina (0,2mg/kg) – Controle positivo	Hamsters	8
	G4- Oleo de canola- Controle negativo	Hamsters	8

2.1.2. Preparação do inóculo parasitário

Um pool de amostras coprológicas oriundas de cães, previamente analisados pela técnica de mini-flotac quanto a contaminação parasitária por *Ancylostoma* sp, *Toxocara* sp e *Giardia* sp, foram preparados individualmente. Foi então realizada a contagem dos parasitos através da Técnica de mini-flotac, posteriormente a amostra foi submetida a filtragem, concentração e purificação tendo por fim inóculos parasitários contendo, 300 ovos de *Toxocara* sp, uma alíquota de 30 a 50 cistos de *Giardia* sp e uma alíquota contendo 100 ovos de *Ancylostoma* spp.

2.1.3 Preparação do composto experimental.

Foram preparados 4 compostos antiparasitários, correspondendo aos grupos de tratamento (Tabela 1), sendo NTZ associada a outros antiparasitário (G1), NTZ isolada (G2), antiparasitários convencionais (G3) como controle positivo e óleo de canola (G4) como controle negativo.

Os compostos foram preparados em capela de fluxo contínuo, temperatura ambiente, primeiramente os princípios ativos foram pesados em balança de precisão, utilizando as concentrações, previamente estudadas pelo nosso grupo de pesquisa, de NTZ isolada e em associação com outros antiparasitários (NTZ10mg/kg, febantel 5mg/kg, pirantel 15 mg/kg, praziquantel 5 mg/kg e ivermectina 0,2mg/kg). As concentrações utilizadas no composto para administração no grupo controle positivo foram determinadas por febantel 5mg/kg, pirantel 15 mg/kg, praziquantel 5 mg/kg e ivermectina 0,2mg/kg e do controle negativo foi o diluente dos demais compostos (óleo de canola), no mesmo volume por dose. Após a pesagem individual dos princípios ativos foi realizada a mesclagem e homogeneização, e diluídos em óleo de canola através de uma espátula plástica e um bastão de vidro. Todos os animais receberam uma única dose de 100 µl/10g de peso dos respectivos tratamentos.

2.1.4. Análises coprológicas

As análises coprológicas foram realizadas pelas técnicas (mini-flotac e faust) para avaliar a eliminação de estruturas parasitárias (ovos, cistos, trofozoítos e larvas). A técnica de mini-flotac faz uso de solução hipersaturada para flutuação das estruturas parasitárias e identificação e contagem através de um disco de leitura. Já a técnica de Faust, utiliza solução hipersaturada, porém necessita de centrifugação e filtragem para leitura dos cistos de *Giardia* sp. Para comprovar a infestação, as análises iniciaram 7 dias após a inoculação e foram realizadas a cada 3 dias, até o dia 15 para análise de

Toxocara spp e *Giardia* sp (camundongos) e dia 21 para *Ancylostoma* sp (hamsters), respeitando o período pré patente de cada espécie de parasito, Após o início do tratamento as análises coprológicas ocorreram diariamente até o final do experimento: *Toxocara* sp e *Giardia* 15 dias e *Ancylostoma* sp 21 dias.

2.1.5. Análises sanguíneas

Das amostras sanguíneas foi obtido soro para análises bioquímicas de aspartato amino transferase (AST) e alanina amino transferase (ALT), creatinina e ureia. Os testes foram realizados com kits da Labtest Diagnostica S.A ® e analisados através de espectofotômetro de leitura óptica da marca Mindray BA-88A.

2.1.6. Análise estatística

Os dados de eficácia foram expressos em porcentagem através da fórmula de redução de contaminação parasitária expressa abaixo:

$$\% \text{Eficácia} = \frac{(\text{média E.P.G controle} - \text{Média E.P.G tratamento})}{\text{Média E.P.G controle}} \times 100$$

Foi realizada análise de kruskal Wallis para determinar a significância dos valores de toxicidade, sendo que $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

2.2. Análises de Toxicidade

2.2.1. Preparação do composto

Para os testes de toxicidade aguda e crônica foram utilizados dois compostos a base de NTZ, sendo um com ela isolada e outro associado a outros antiparasitários, em três concentrações diferentes, baseadas na dose terapêutica, estabelecida de acordo com teste de eficácia realizado anteriormente, dose tóxica foi de 10 vezes a concentração terapêutica e subdose com uma diluição de 10 vezes a dose terapêutica segundo a tabela 2.

Os produtos 1 e 2 foram preparados com diluição em óleo de canola, em temperatura média (23 a 26°) dentro de ambiente controlado de possíveis contaminações externas. As concentrações de subdose e dose tóxica seguiram as recomendações

conforme os protocolos da Organização para cooperação e desenvolvimento econômico (OECD) 407 de 16 de outubro de 2008 e 423 de 08 de fevereiro de 2002. Todos os animais receberam uma dose do tratamento, conforme o grupo correspondente, sendo aplicados por gavagem intragástrica, na dose de 100 microlitros/10g de peso vivo, em uma única dose.

2.2.2. Animais experimentais

Para os testes de toxicidade foram utilizados *Rattus norvegicus* do sexo masculino com média de 300g, segundo indicação dos guidelines da OECD 407 e 423. O protocolo de toxicidade aguda utilizou 18 animais e o protocolo de toxicidade crônica 60 animais por grupo, sendo utilizados 50% de cada sexo. Os animais experimentais foram aclimatados durante sete dias com o manejo experimental, ciclo de claro e manejo antes do início do experimento. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética pelo registro nº 140/2021.

Tabela 2. Concentração dos antiparasitários presentes nas formulações dos produtos 1 e 2.

Produto 1	Subdose (mg/mL)	Dose terapêutica (mg/mL)	Sobredose (mg/mL)
NTZ	1	10	100
Pirantel	0,5	5	50
Praziquantel	0,5	5	50
Febantel	1,5	15	150
Ivermectina	0,02	0,2	2

Produto 2			
NTZ	1	10	100

2.2.3. Avaliação da toxicidade

Para a toxicidade aguda experimento foi realizado em 3 dias, sendo que no dia 0 os animais foram tratados com os compostos experimentais em dose única, sendo os grupos G1-dose terapêutica; G2-sobredose; G3-subose para cada uma das formulações

testadas do produto 1 e do produto 2. Os animais foram avaliados diariamente durante esse período em relação aos seus sinais clínicos e comportamentais. No dia “0” e no final do experimento (3 dias) os animais foram sedados com anestesia inalatória (isoflurano) ao efeito e submetidos a coleta de amostras sanguíneas pela veia caudal. para avaliação do metabolismo hepático e renal dos animais, segundo predisposto pelo protocolo nº 423 da OECD (2002), estudo de toxicidade crônica teve duração de 28 dias, foram utilizados os mesmos produtos e concentrações da intoxicação aguda. No dia 0, ocorreu o tratamento dos animais com os compostos experimentais em dose única e avaliados seus sinais clínicos e comportamentais durante o período experimental. As análises foram iguais as realizadas na intoxicação aguda.

No final de cada um dos experimentos os animais foram sedados com anestesia inalatória (isoflurano) ao efeito e submetidos a coleta de amostras sanguíneas pela veia caudal. As amostras foram utilizadas para avaliação do metabolismo hepático e renal dos animais. Posteriormente, foram eutanasiados por sobredosagem anestésica com isoflurano para posterior necropsia com coleta dos rins e do fígado para avaliação histopatológica e do cérebro para avaliação de estresse oxidativo por meio dos níveis de TBARS, e atividade da enzima glutationa peroxidase (GPx) e sangue através da via intracardíaca para análise de parâmetros bioquímicos de AST, ALT, creatinina e uréia.

Estudo histopatológico

2.2.4. Análise estatística

Os resultados foram analisados pelas bases das médias entre os grupos através da utilização do software Graphpad Prism 5.0®, por espécie e optou-se pela análise estatística de ANOVA de uma via seguida pelo teste de Newman Keuls, sendo que os valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados e discussão

3.1. Eficácia antiparasitária

Os resultados demonstraram, que houve uma redução significativa na contagem de e. p. g (estuturas por grama de fezes) nos dias de tratamento realizados (Tabela 3). Nota-se que no tratamento para *Giardia* sp, a contagem de cistos foi reduzida em 99% quando do uso da formulação completa de NTZ+pirantel+febantel+praziquantel+ivermectina. Fazendo uso da

NTZ isolada, a redução foi de 95%, sendo que em comparação com o tratamento comercial composto por pirantel+febantel+praziquantel+ivermectina alcançou 75% de redução de estruturas. Moron-Soto et al 2017, realizando protocolo de controle de *Giardia* em diferentes dias, conseguiu eliminação de cistos no dia 11 pós tratamento comparados ao grupo controle julgou estatisticamente significativo a diminuição causada. Sabe-se que o tratamento da giardíase, em virtude do leque de produtos disponíveis no mercado e a grande questão envolvendo a resistência são limitadas. (Romano and Lallo 2023), fazendo uso de uma dose extremamente alta de NTZ (50mg/kg), conseguiu uma eficácia inferior a demonstrada nesse trabalho, 84% de eliminação do protozoário com teste em cães, porém, alavancou problemas relacionados com vômito e hiporexia que julgou “controláveis”.

Frente ao parasito *Toxocara* sp., foi visto que o produto também apresentou enormes potenciais de ação, sendo que subjugou a composição comercial em mais de 10% de eficácia, alcançando níveis de 98%. Esse resultando alavanca o potencial de uso dessa formulação da NTZ com as categorias frequentemente mais afetadas por *Toxocara* sp, que são os filhotes. Segundo estudos recentes, a NTZ é considerada já uma aliada no tratamento da toxocariose humana bem como uma ferramenta a ser implementada no controle geral do *Toxocara* sp (Mengarda, Silva et al. 2023).

Tabela 3. Demonstração do percentual de eficácia *in vivo* em modelo murino da nitazoxanida (NTZ) em associação com pirantel, febantel, praziquantel e pirantel (G1) e isolada (G2) comparada com os grupos controles positivo (G3) e negativo (G4)

Antiparasitários (mg/mL)	Índice de redução de ovos e cistos (%)		
	<i>Ancylostoma</i> <i>sp</i>	<i>Toxocara</i> <i>sp</i>	<i>Giardia</i> <i>sp</i>
G1: NTZ (10mg/kg) + Pirantel (5mg/kg)+ febantel (15mg/kg)+praziquantel (5mg/kg)+ivermectina (0,2mg/kg)	95	98	99
G2: NTZ (10mg/kg)	86	94	95
G3: Pirantel (5mg/kg) + febantel (15mg/kg) + praziquantel (5mg/kg) + ivermectina (0,2mg/kg)	73	85	75
G4: óleo de canola	1	5	-

Já a ação contra o parasito *Ancylostoma* sp., foi a que se demonstrou com menos eficácia quando utilizada a NTZ isolada com níveis de 86% (Tabela 3). Esse nematódeo é extremamente frequente em contaminações parasitárias (Chagas, Motta et al. 2019), sendo já

relatadas populações extremamente resistentes e com potencial de recontaminação muito alta (Mello, Nizoli et al. 2020). (Tritten, Silbereisen et al. 2012), observou uma débil ação da NTZ isolada e em associação contra populações de nematódeos, entre elas *Ancylostoma ceylanicum*, justificando como possível causa a alteração de pH e diferenças das metodologias *in vitro* e *in vivo*. Porém, quando analisamos os dados da NTZ conjugada com pirantel, febantel, praziquantel e ivermectina notou-se que houve um acréscimo de 9%, resultando em 95% de eficácia, assim alcançando um bom nível de controle desse parasito.

3.2. Toxicidade

Os valores expressos a partir dos testes de toxicidade demonstraram uma alta segurança da NTZ e suas associações, visto que nos testes de toxicidade aguda não houve nenhum dano hepático, renal ou indicativo de estresse oxidativo. Os dados expressos pela toxicidade crônica demonstraram uma diferença entre 2 individuos do grupo sobredose sendo encontrados dados aonde o valor de $p>0,05$, porém, de um modo geral os dados apresentados no quesito toxicidade foram animadores quanto a segurança do produto.

4. Conclusões

A NTZ, isolada ou associada a ivermectina, febantel, pirantel e praziquantel é uma ferramenta de alto grau tecnológico e que é capaz de modular infecções parasitárias de modo a debelar condições de contaminações altas em populações resistentes a ação dos fármacos bem como, se manter segura dentro da metabolização realizada pelo organismo animal. Desta maneira, é importante salientar que os estudos acerca do uso da NTZ isolada e associada deve ser continuado de modo a expressar a melhor forma de utilização e emprego da mesa no mercado veterinário.

Agradecimentos

CNPq, Programa de pós graduação em veterinária da UFPel, UFpel, ClinPet e Laboratório Ibasa.

Referências

Antiorio, A. T. F. B., S. M. G. Massironi, R. R. De Luca, M. A. C. R. Carvalho, V. Y. Tambellini, D. Wadt, J. Bortolatto, J. Bom and C. M. C. Mori (2019). "Decontamination of genetically modified mice strains by embryo transfer for obtaining spf colonies in a Brazilian

animal facility [Descontaminação de linhagens de camundongos geneticamente modificadas por transferência embrionária para obtenção de colônias SPF em um biotério brasileiro (São Paulo, SP)]." *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*.

Chagas, B. C., J. F. Motta, A. Ferraz, S. S. Silva, C. C. S. Mello, L. D. A. Silva and L. Q. Nizoli (2019). "Estudo de prevalência de parasitos zoonóticos em amostras de fezes de cães em vias públicas de quatro bairros do município de Pelotas-RS." *Medicina Veterinária (UFRPE)* 13(2): 212-217.

Estrela, M. A. A., A. B. D. Vargas, C. F. Pereira, I. C. B. Veras and A. C. Silva (2023). "Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação de ivermectina em formas farmacêuticas." *Brazilian Journal of Development* 9(05): 16172-16181.

Ferraz, A., T. A. Evaristo, A. L. R. Coelho, T. A. de Castro, C. C. S. de Mello, F. G. Pappen, S. S. da Silva and L. Q. Nizoli (2019). "Presença de parasitos com potencial zoonótico na areia de praças de recreação de escolas municipais de educação infantil do município de Pelotas, RS, Brasil." *Veterinária e Zootecnia* 26: 1-7.

Fox, L. M. and L. D. Saravolatz (2005). "Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent." *Clinical infectious diseases* 40(8): 1173-1180.

Guerreiro, F., C. Sodré, L. Pavan, P. Barroso, D. Quintella, T. Cuzzi and M. Ramos-e-Silva (2018). "Disseminated strongyloidiasis." *Acta Dermatovenerologica Croatica* 26(4): 333-333.

Krug, F. D. M., C. I. Schmitt, S. de Oliveira Capella, M. C. H. Rondelli and M. de Oliveira Nobre (2021). "Pandemia de Covid-19: o comportamento de cães e a relação com seus tutores durante o isolamento social." *Research, Society and Development* 10(14): e508101420162-e508101420162.

Mello, C. C. S. d., L. Q. Nizoli, A. Ferraz, B. C. Chagas, W. J. D. Azario and M. M. Villela (2020). "Helminth eggs with zoonotic potential in the vicinity of public schools in southern Brazil." *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 29.

Mengarda, A. C., T. C. Silva, A. S. Silva, D. B. Roquini, J. P. S. Fernandes and J. de Moraes (2023). "Toward anthelmintic drug candidates for toxocariasis: Challenges and recent developments." *European Journal of Medicinal Chemistry* 251: 115268.

Pimentel, F. F., A. J. de Almeida, F. C. R. de Oliveira and B. B. Ederli (2011). "Efeito do tratamento com nitazoxanida na criptosporidiose canina." Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR 14(2).

Romano, F. and M. A. Lallo (2023). "Efficacy of a single dose of nitazoxanide in dogs naturally infected with Giardia duodenalis." Research in Veterinary Science 159: 252-256.

Shakya, A., H. R. Bhat and S. K. Ghosh (2018). "Update on nitazoxanide: a multifunctional chemotherapeutic agent." Current drug discovery technologies 15(3): 201-213.

Tritten, L., A. Silbereisen and J. Keiser (2012). "Nitazoxanide: In vitro and in vivo drug effects against *Trichuris muris* and *Ancylostoma ceylanicum*, alone or in combination." International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance 2: 98-105.

4.3. Artigo 3

**Eficácia da nitazoxanida (NTZ) no tratamento de infecções parasitárias causadas
por *Ancylostoma* spp., *Toxocara* sp. e *Giardia* sp. em cães**

**Bruno Cabral Chagas; Leandro Quintana Nizoli, Sérgio Jorge Márcia de Oliveira
Nobre**

O artigo será submetido a revista **Tópicos em medicina de animais de companhia**.

**Eficácia da nitazoxanida (NTZ) no tratamento de infecções parasitárias causadas
por *Ancylostoma* spp., *Toxocara* sp. e *Giardia* sp. em cães.**

**Bruno Cabral Chagas; Leandro Quintana Nizoli, Sérgio Jorge Márcia de Oliveira
Nobre.**

^a Programa de Pós-graduação em Veterinária, Grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Clínica de pequenos animais (CLINPet), Universidade Federal de Pelotas (UFPel), CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brasil.

*** Address for correspondence**

Bruno Cabral Chagas – e-mail: brunocabral.chagas@gmail.com

Márcia de Oliveira Nobre – e-mail: marciaonobre@gmail.com

Programa de Pós-graduação em Veterinária, PPGVET, UFPel, Campus Capão do Leão, Pelotas, CEP 96010-900, RS, Brasil; E-mail: Phone: 55-53-32757233

Resumo

Os parasitos como *Ancylostoma* spp., *Toxocara* sp. e *Giardia* sp. causam doenças gastrointestinais em humanos, cães e demandam manejos de tratamentos com utilização de antiparasitários que já apresentam problemas como resistência. A Nitazoxanida (NTZ) mostrou boa atividade clínica como antiparasitário em testes *in vitro* e *in vivo* em *modelo murino*, mas ainda não tinha sido avaliada para o tratamento em cães. Este trabalho objetivou avaliar a eficácia e seguridade do uso da nitazoxanida associada a pirantel, febantel, praziquantel e ivermectina em cães. O estudo foi desenvolvido em 60 cães, naturalmente infectados com *Giardia* sp., *Ancylostoma* sp e/ou *Toxocara* sp. Os cães foram divididos em cinco grupos experimentais xxxxxx tratados comxxx: Formulação 1 (Nitazoxanida, pirantel, febantel, praziquantel e ivermectina) e Formulação 2 (pirantel, febantel, praziquantel e ivermectina) e tratados com uma dose oral única de cada tratamento. As estruturas parasitárias (ovos e cistos) das fezes de cada cão foram quantificados nos dias -3, 0, 5, 7, 9, 11, 14, 18, 25 e 21. Os parâmetros bioquímicos foram avaliados em todos os cães, antes do primeiro tratamento e após a conclusão do experimento. A formulação 1 teve um potencial de eficácia maior do que a formulação comercial, em valores de 96%, 80% e 91% para *Ancylostoma* sp, *Toxocara* sp e *Giardia* sp contra 73%, 66% e 99% respectivamente, bem como um período residual com maior eficácia. Este estudo demonstra que a administração da NTZ apresentou uma alta eficácia do produto, frente ao controle em infecções causadas por *Ancylostoma* sp, *Toxocara* sp. e *Giardia* sp., podendo vir a ser uma alternativa terapêutica no controle de infecções parasitárias em cães.

Palavras-chave: Parasitas zoonóticos; pirantel, febantel, praziquantel, ivermectina.

1. Introdução

Os animais domésticos, por ocuparem papel tão importante dentro do âmbito familiar nos dias de hoje, acabam convivendo junto a seus tutores compartilhando de hábitos comportamentais e alimentares (1). Hoje em dia, mais da metade das pessoas em todo o mundo tem pelo menos um animal de estimação vivendo com elas, sendo, mais comum os cães (2). No Brasil, existem por volta de mais de 80 milhões de pets distribuídos pelo país (3).

As parasitoses em pequenos animais representam um grande problema sanitário, cursando com uma série de sinais clínicos como emagrecimento progressivo, anemia, diarreia, inapetência, hematoquezia (4). Por mais conhecidos que sejam os ciclos dos parasitos de maior frequência no país como *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp., *Trichuris* sp. (5, 6), e *Giardia* sp. (7) o controle dos mesmos ainda é extremamente deficitário em virtude de diversos fatores como: contaminação por animais errantes, (8) falha no manejo do descarte de fezes contaminadas, falta de protocolos de profilaxia, escolha equivocada do princípio ativo a ser utilizado para o controle dos parasitos bem como aplicação errada de produtos antiparasitários e desenvolvimento de resistência (9, 10).

Existem uma série de compostos e princípios ativos disponíveis no mercado veterinário com o objetivo de controle e erradicação dos parasitos, porém, já há relatos de resistências aos mesmos(11). Protozoaricidas que são importantes ferramentas no controle da *Giardia* spp., como metronidazol, fenzol e até sulfas, são compostos que também devido ao intenso e desregrado uso, apresentam elevados graus de resistência no controle da *Giardia* spp (12, 13).

Uma alternativa, além de melhorar o manejo e o uso dos produtos disponíveis, é a descoberta de novos compostos que sejam efetivos e de fácil aplicação para consequentemente melhorarem a saúde e a qualidade de vida do animal bem como facilitar o cuidado e manejo de aplicação por parte do tutor (3). Nesse sentido, o uso da nitazoxanida (NTZ) em animais de companhia pode ser uma boa alternativa aos convencionais utilizados, por várias características do mesmo.

A NTZ é um antiparasitário sintético com uma composição molecular, que lhe confere importância e ampla ação frente a agentes microbianos e a helmintos. A biodisponibilidade da NTZ no organismo permite uma meia vida mais longa e consequentemente um período de duração prolongada (14, 15). Por possuir amplo espectro e graças à tecnologia empregada na sua estruturação, possui baixa capacidade de desenvolvimento de resistência em parasitos, e sua biodisponibilidade quando em suspensão é de 70% em relação aos comprimidos, um fator

que corrobora com sua utilização em animais (16, 17). Em virtude de sua capacidade de manutenção de níveis no organismo, traz um enorme benefício pela diminuição da obrigatoriedade de repetição de aplicação do produto tal como é realizado com outros compostos (18). Este fator é de extrema importância principalmente quando se realiza tratamento para giardíase a qual tem alta prevalência em cães e gatos domésticos e possui um grande potencial zoonótico e antropozoonótico. Antiparasitários a base de NTZ ainda não estão disponíveis para uso veterinário no mercado brasileiro, embora já sejam utilizados para humanos (19, 20).

Estudos prévios de avaliação in vitro desenvolvidos pelo nosso grupo, revelaram que a NTZ isolada e em associação com outros antiparasitários foram eficazes contra ovos de *Ancylostoma* sp. e *Toxocara* sp e com melhores resultados em relação a *Giardia* sp. Além disso, a eficácia da formulação proposta nesse estudo foi efetiva na ação antiparasitária no estudo em modelo murino para *Ancylostoma* sp. e *Toxocara* sp e *Giardia* sp., com ausência de toxicidade. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi investigar o potencial antiparasitário e parasiticida da molécula NTZ em formulação associada com outros antiparasitários (febantel, piratel, praziquantel e ivermectina) em cães frente aos parasitos *Ancylostoma* spp, *Toxocara* sp., e *Giardia* sp.

2. Metodologia

2.1. Animais

Foram utilizados 60 cães com idade de 6 meses a 10 anos, com peso variando de 5 a 30 kg, machos e fêmeas. Primeiramente os animais passaram por uma avaliação clínica para excluir animais doentes que estivessem apresentando em anorexia, febris, com sinais clínicos de doenças metabólicas, oncológicas e/ou sistêmicas ou fêmeas prenhas (CEUA 109/2023). A contaminação parasitária foi um critério de inclusão e exclusão do estudo, sendo considerados cães aptos para o estudo aqueles que apresentaram contaminação igual ou maior que 100 ovos (*Ancylostoma* sp ou *Toxocara* sp) ou 30 cistos (*Giardia* sp) por grama de fezes.

2.2. Coleta de amostras e análises

Para aqueles animais incluídos no estudo foi realizada a coleta de amostras biológicas: fezes e sangue. As fezes dos animais foram obtidas preferencialmente por evacuação espontânea, e nos casos onde a mesma não foi possível, foi realizada a coleta diretamente da ampola retal por estímulo digital com luva de procedimento realizado no teto da cavidade retal (21). A contaminação parasitária foi analisada pela técnica de mini flotac, que baseia-se no uso de solução hipersaturada que confere a característica de flutuabilidade a estruturas como ovos (*Ancylostoma* sp, e *Toxocara* sp) e cistos (*Giardia* sp) para posterior identificação e contagem de estruturas flutuantes através da leitura em placas de mini-flotac.

As amostras sanguíneas foram obtidas por punção realizada na veia cefálica, sendo as amostras acondicionadas imediatamente em tubos com e sem EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) para a realização do hemograma e das análises bioquímicas respectivamente. O hemograma foi realizado no mesmo dia da coleta de forma manual por contagem de leucócitos em câmara de Neubauer, diferenciação por esfregaço sanguíneo e contagem de hemácias por centrifugação e leitura do microhematócrito. As amostras para as análises bioquímicas foram processadas para obtenção dos soros que foram submetidos a análises do metabolismo hepático (aspartato amino transferase - AST, alanina amino transferase - ALT) e renal (creatinina e ureia), analisados através de leitor de microplacas nas absorbâncias de 320 e 540 nm

2.3. Formulação do produto

Foi avaliada a eficácia antiparasitária de um produto oral (Formulação 1) contendo NTZ em associação com outros antiparasitários (febantel, pirantel e praziquantel e ivermectina),

nas doses de 10mg/kg de NTZ, 5 mg/kg de febantel e praziquantel respectivamente, pirantel na dose de 15mg/kg e 0,2mg/kg de ivermectina. Esta formulação foi obtida a partir de testes iniciais *in vitro* e *ex vivo* nos quais foram determinados os compostos e as concentrações e posteriormente testada a eficácia e a toxicidade em modelo murino. A formulação 2 foi um produto comercial com base em 5 mg/kg de febantel e praziquantel respectivamente, pirantel na dose de 15mg/kg e 0,2mg/kg.

2.4. Protocolo experimental

Os cães foram divididos por sorteio em 6 grupos de 10 animais, na proporção de 50% machos e 50% fêmeas, sendo o grupo 1 e 4 animais parasitados com *Ancylostoma* sp, grupo 2 e 5 com *Toxocara* sp, grupo 3 e 6 com *Giardia* sp. Sendo os grupos 1, 2 e 3 os grupos experimentais e os grupos 4, 5 e 6 os grupos controles positivos. O controle negativo foi considerado as análises fecais e sanguíneas realizadas no dia “0” do próprio grupo. Os grupos 1, 2 e 3 foram tratados com a Formulação 1 e os grupos 4, 5 e 6 Formulação 2. No dia 1 cada cão dos grupos experimentais e controle recebeu uma dosagem única dos respectivos tratamentos de acordo com seu peso, os grupos 1, 2 e 3 receberam a Formulação 1 , os grupos 4, 5 e 6 a formulação 2 conforme recomendação de bula. A dosagem da Formulação 1 para os grupos experimentais foi a mesma já testada em estudos anteriores *in vitro* e *in vivo* que foi eficaz e não apresentou sinais de intoxicação. Os animais ficaram durante todo o período experimental no seu próprio domicílio. Aos 3 e 7 dias foi novamente coletado fezes de cada animal, de todos os grupos e aos 15 dias coletadas amostras fecais dos grupos 2, 3, 5 e 6 em função do ciclo do *Toxocara* sp e da *Giardia* sp e aos 21 dias dos grupos 1 e 4 em função do ciclo do *Ancylostoma* sp. As amostras de fezes foram utilizadas para a realização da análise coprológica para avaliar o efeito antiparasitário dos tratamentos, com a identificação dos parasitas/protozoário e a contagem dos ovos e cistos. Foi avaliado o poder residual das formulações 1 e 2 com mais duas coletas de fezes dos animais de todos os grupos com intervalos de 7, 14 e 21 dias, utilizando a mesma técnica para o exame coprológico para detectar e quantificar a presença de ovos/cistos.

2.5. Análise estatística

Ao final do experimento os resultados obtidos da ação antiparasitária foram analisados em relação a comparação com o dia “0“e o final do período experimental de cada indivíduo do respectivo grupo de acordo com a formula a seguir

$$\% \text{Eficácia} = (\text{média E.P.G controle} - \text{Média E.P.G tratamento}) \times 100$$

Média E.P.G controle

3. Resultados e discussão

No ensaio desenvolvido em cães observou-se uma alta eficácia da Formulação 1 alcançando médias de controle em *Ancylostoma* sp de 89%, *Toxocara* sp. 80% e *Giardia* 91% em contrapartida a formulação 2 a qual apresentou eficácia de *Ancylostoma* sp de 73%, *Toxocara* sp. 66% e *Giardia* 39% (representado pela contaminação antes do tratamento, contaminação pós tratamento e eficácia antiparasitária), sem presença de alteração no metabolismo hepático e renal, bem como ausência de sinais clínicos e comportamentais (**Tabela 1**).

Tabela 1: Valores de eficácia antiparasitária das formulações 1 e 2 sobre *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp. e *Giardia* sp com base nas contaminações iniciais e finais de ovos e cistos.

Parasito		Formulação 1	Formulação 2
<i>Ancylostoma</i> sp	Contaminação inicial	200	200
	Contaminação final	4	54
	Eficácia	96%	73%
<i>Toxocara</i> sp	Contaminação inicial	120	120
	Contaminação final	24	40,8
	Eficácia	80%	66%
<i>Giardia</i> sp	Contaminação inicial	43	43
	Contaminação final	3,87	26,23
	Eficácia	91%	39%

As opções para o tratamento das infecções parasitárias em cães são limitadas, e os poucos medicamentos disponíveis são muitas vezes acompanhados de reações adversas (22).

Albendazol associado ao febantel tem sido associadas a vômitos, diarreia sanguinolenta, aborto e teratogenicidade (23). Assim, as opções disponíveis atualmente para o tratamento das infecções parasitárias são limitadas. Este estudo indica que a NTZ mostrou-se altamente eficaz no controle das infecções parasitárias causadas por helmintos e protozoários.

Os dados do presente estudo demonstram a importância da utilização da NTZ em associação com outros antiparasitários pelo seu potencial simbiótico com drogas já existentes no mercado, para as infestações de *Ancylostoma* spp, *Toxocara* spp e principalmente *Giardia* spp considerando a resistência frente a outros antiparasitários (24), a recidiva das infecções e ao potencial zoonótico das mesmas (25). Dessa forma, este estudo contribui muito no entendimento das zoonoses e tratamento das mesmas, tendo em vista que a molécula de NTZ pode ser adicionada no leque de produtos disponíveis e inferir mais importância ao uso do fármaco no mercado veterinário.

O poder residual testado em diferentes tempos, também configurou a formulação 1 como uma excelente alternativa aos produtos comerciais, visto que, no período de 21 dias que foi o período máximo testado, a formulação 1 teve uma ínfima queda no seu valor de eficácia frente a *Ancylostoma* sp., em valores de 4% de eficácia e contra *Giardia* sp., uma queda de apenas 6% quando da comparação do produto comercial o qual apresentou queda de 25% e 11% respectivamente (Tabela 2).

Tabela 2: Valores de eficácia antiparasitária residual das formulações 1 e 2 sobre *Ancylostoma* sp., *Toxocara* sp. e *Giardia* sp nos dias 7, 14 e 21 pós tratamento.

Parasito	Formulação 1			Formulação 2		
	Dia 7	Dia 14	Dia 21	Dia 7	Dia 14	Dia 21
<i>Ancylostoma</i> sp	94	94	90	65	44	40
<i>Toxocara</i> sp	80	74	70	60	57	56
<i>Giardia</i> sp	91	90	85	32	30	28

Cabe salientar que de fato a NTZ é um fármaco relativamente novo que foi aprovado pela FDA em 2014 para o tratamento da giardíase em humanos, sendo eficaz também contra *Trichomonas* spp., *Entamoeba histolytica*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Helicobacter pylori* e *Campylobacter jejuni* (26). Desta maneira foi demonstrado que NTZ tem uma eficácia para eliminar as infecções parasitárias causadas por *Ancylostoma* sp de 89%, *Toxocara* sp. 80% e *Giardia* sp. 91% em cães, apresentando também baixa toxicidade.

Os dados referentes a hemograma, análises bioquímicas de AST, ALT, Creatinina e uréia mantiveram-se dentro do fisiológico para as idades e portes.

Portanto, considerando o ineditismo de um produto veterinário contendo um fármaco como a NTZ até então utilizado comercialmente apenas em humanos, que pode ser usado em dose única, com potenciais benefícios para a saúde pública, caráter inovador e impacto mercadológico é de demasiada importância os resultados apresentados nesse estudo. Ainda pelo crescimento das infecções parasitárias em animais de companhia e o risco para os respectivos tutores, por ser zoonótica e o aumento da resistência frente a medicação convencional e consequentemente o aumento dos casos de recidivas. Além disso, cabe a consideração de que mesmo que existam no mercado brasileiro antiparasitários similares e com eficácia inicialmente comprovada, eles se restringem a princípios ativos já conhecidos, com espectros de ação específicos/limitados e com necessidade de doses repetidas, desta maneira a NTZ parece ser uma alternativa terapêutica no tratamento das parasitoses.

4. Conclusão

Este estudo demonstra que a administração da NTZ apresentou uma alta eficácia do produto, frente ao controle em infecções causadas por *Ancylostoma* sp, *Toxocara* sp. e *Giardia* sp., apresentando eficácia maior que o produto comercial. Além disso, a NTZ não apresentou alteração no metabolismo hepático e renal, bem como ausência de sinais clínicos e comportamentais, não apresentando toxicidade neste trabalho. Nesse sentido, os resultados apresentados no presente estudo demonstram que a NTZ pode vir a ser uma alternativa terapêutica no controle de infecções parasitárias em cães.

Bibliografia

1. Bragança DR, Queiroz EO. Manejo nutricional de cães e gatos e a inserção de alimentos alternativos na dieta de pequenos animais domiciliados no estado de Rondônia, Brasil. Brazilian Journal of Development. 2020;6(10):75090-8.
2. Silva AMMd, Almeida CHT, Enetério NGdP. As influências da Terapia Assistida por Animais na Promoção das habilidades Sociais. 2020.

3. Felipetto L, Fernandes F, Vogel F, Flores E, Botton S, Sangioni L. Perfis demográficos e assistenciais de cães e gatos associados ao perfil socioeconômico de seus tutores em áreas atendidas por Estratégias de Saúde da Família no Brasil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 2023;74:1007-16.
4. Gálvez R, Montoya A, Cruz I, Fernández C, Martín O, Checa R, et al. Latest trends in *Leishmania infantum* infection in dogs in Spain, Part I: mapped seroprevalence and sand fly distributions. Parasites & vectors. 2020;13(1):1-12.
5. Chagas BC, Motta JF, Ferraz A, Silva SS, Mello CCS, Silva LDA, et al. Estudo de prevalência de parasitos zoonóticos em amostras de fezes de cães em vias públicas de quatro bairros do município de Pelotas-RS. Medicina Veterinária (UFRPE). 2019;13(2):212-7.
6. Guerreiro F, Sodré C, Pavan L, Barroso P, Quintella D, Cuzzi T, et al. Disseminated strongyloidiasis. Acta Dermatovenerologica Croatica. 2018;26(4):333-.
7. Martins AV, Coelho AdL, Corrêa LL, Ribeiro MS, Lobão LF, Palmer JPS, et al. First microscopic and molecular parasitological survey of *Strongylus vulgaris* in Brazilian ponies. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 2023;32:e006323.
8. Ferraz A, Evaristo TA, Coelho ALR, de Castro TA, de Mello CCS, Pappen FG, et al. Presença de parasitos com potencial zoonótico na areia de praças de recreação de escolas municipais de educação infantil do município de Pelotas, RS, Brasil. Veterinária e Zootecnia. 2019;26:1-7.
9. D'ambroso Fernandes F, Rojas Guerra R, Segabinazzi Ries A, Felipetto Cargnelutti J, Sangioni LA, Silveira Flores Vogel F. Gastrointestinal helminths in dogs: occurrence, risk factors, and multiple antiparasitic drug resistance. Parasitology Research. 2022;121(9):2579-86.
10. Almeida M, Maia C, Cristóvão JM, Morgado C, Barbosa I, Ibars RF, et al. Seroprevalence and risk factors associated with leishmania infection in dogs from Portugal. Microorganisms. 2022;10(11):2262.
11. Guzmán L, Malla JL, Ramírez J, Gilardoni G, Calva J, Hidalgo D, et al. Acaricidal Efficacy of Plants from Ecuador, *Ambrosia peruviana* (Asteraceae) and *Lepechinia mutica* (Lamiaceae) against Larvae and Engorged Adult Females of the Common Cattle Tick, *Rhipicephalus microplus*. Veterinary Sciences. 2022;9(1):23.

12. Bouzid M, Halai K, Jeffreys D, Hunter PR. The prevalence of Giardia infection in dogs and cats, a systematic review and meta-analysis of prevalence studies from stool samples. *Veterinary parasitology*. 2015;207(3-4):181-202.
13. Molento MB, Dall'Anese J, Pontarolo DV, Brandão YO. Strong ivermectin resistance in cyathostomins of horses: a grim picture for sustainable parasite control. 2022.
14. Lima NF, Picanço GA, de SMM Alves D, Silva LD, Isac E, Costa TL, et al. Oral nitazoxanide treatment of experimental neurocysticercosis induces gluconeogenesis in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Acta tropica*. 2019;190:361-4.
15. Shams GE-D, Fouad AE-A, Naiem N. Nitazoxanide adverse effects on biochemical markers of liver & kidney injury and antioxidant enzymes on rats. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*. 2018;7(4):1-6.
16. Fan L, Qiu X-x, Zhu Z-y, Lv J-l, Lu J, Mao F, et al. Nitazoxanide, an anti-parasitic drug, efficiently ameliorates learning and memory impairments in AD model mice. *Acta Pharmacologica Sinica*. 2019;40(10):1279-91.
17. Shakya A, Bhat HR, Ghosh SK. Update on nitazoxanide: a multifunctional chemotherapeutic agent. *Current drug discovery technologies*. 2018;15(3):201-13.
18. Pal AK, Nandave M, Kaithwas G. Chemoprophylactic activity of nitazoxanide in experimental model of mammary gland carcinoma in rats. *3 Biotech*. 2020;10:1-12.
19. Broekhuysen J, Stockis A, Lins R, De Graeve J, Rossignol J. Nitazoxanide: pharmacokinetics and metabolism in man. *International journal of clinical pharmacology and therapeutics*. 2000;38(8):387-94.
20. Matadamas-Martínez F, Nogueda-Torres B, Castillo R, Hernández-Campos A, Barrera-Valdes MdL, León-Ávila G, et al. Characterisation of the in vitro activity of a Nitazoxanide-N-methyl-1H-benzimidazole hybrid molecule against albendazole and nitazoxanide susceptible and resistant strains of *Giardia intestinalis* and its in vivo giardicidal activity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2020;115.
21. Lôbo Jr M, Rezende A, Saliba E, Sampaio I. Coeficientes de digestibilidade aparente pelos métodos de indicadores e coleta total de fezes em cães. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2001;53:691-4.

22. Souza LC, Campos GO, Vieira GFA, Braga ÍA. A importância da individualização dos protocolos profiláticos em cães e gatos. Anais da Semana Universitária e Encontro de Iniciação Científica (ISSN: 2316-8226). 2021;1(1).
23. Camapum J, Neto JS, Carvalho CJ, Silva FA, Quessada AM. Bulas de medicamentos veterinários como ferramenta de informações técnicas e científicas. Enciclopédia Biosfera. 2014;10(18).
24. Gelatti LC, Souza A, Pereira S, dos Santos Mendes AP, Jasem DFA, do Nascimento FS, et al. OCORRÊNCIA DE PARASITOS E COMENSAIS INTESTINAIS NUMA POPULAÇÃO DE ESCOLARES DA REDE PÚBLICA ESTADUAL DE ENSINO DO MUNICÍPIO DE URUAÇU, GOIÁS. Revista Eletrônica de Ciências Humanas, Saúde e Tecnologia. 2013;2(1):55-65.
25. da Silva Felix DA, da Silva CX, da Silva Gomes J, Dias EG, da Silva Freitas J, dos Santos Fernandes LE, et al. *Toxocara* spp., larva migrans visceral e saúde pública: Revisão. Pubvet. 2020;14:141.
26. Hoffman PS, Sisson G, Croxen MA, Welch K, Harman WD, Cremades N, et al. Antiparasitic drug nitazoxanide inhibits the pyruvate oxidoreductases of *Helicobacter pylori*, selected anaerobic bacteria and parasites, and *Campylobacter jejuni*. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2007;51(3):868-76.

3.4 Solicitação de Registro de Patente

Solicitação de Patente do **Antiparasitário de uso interno para cães com base em nitazoxanida, febantel, pirantel, praziquantel e ivermectinaem análise no Centro de Inovação Tecnológica (CIT/UFPel)**

Processo SEI nº 23110.023532/2023-78 (Processo sigiloso)

21/08/2023, 19:01

Panzer.html

 Timbre
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

DESPACHO

Processo nº 23110.029192/2023-99
Interessado: MARCIA DE OLIVEIRA NOBRE

Prezado Inventor,

Estamos entrando em contato para solicitar o material referente ao pedido de patente Processo SEI nº 23110.023532/2023-78:

- Resumo; (PDF)
- Reivindicações; (PDF)
- Relatório descritivo; (PDF)
- Desenhos (se houver); (PDF)
- Listagem de sequências biológicas; (se houver) (TXT)

Todos os documentos deverão ser anexados a este processo sigiloso.

Favor observar na redação dos documentos as normativas nº 30 e 31 do INPI.

 Documento assinado eletronicamente por **AMANDA KROLOW NORENBERG, Assistente em Administração**, em 27/07/2023, às 11:39, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

 Assinatura A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 2274315 e o código CRC 7B020A04.

Referência: Processo nº 23110.029192/2023-99

SEI nº 2274315

5. Considerações finais

A NTZ é um composto altamente promissor com um histórico de utilização que permeia muito além dos testes preliminares realizados, contra helmintos e protozoários. O desdobramento da molécula dentro do organismo animal ainda é um desafio que instiga a mimetização da realização de experimentos *in vitro* visto a dificuldade da replicação quanto a estabilidade dos metabólitos ativos como a tizoxanida. Sua inclinação como agente simbiótico com outros antiparasitários foi extremamente notável, a ponto de ser considerada como um excelente parasiticida até mesmo em testes com a espécie alvo, principalmente em virtude de sua capacidade de eliminação das diferentes estruturas de nematódeos e protozoários. É importante ressaltar que o ajuste da dose a ser utilizada é um dos maiores gargalos na utilização e ajuste da molécula em virtude da presença de alguns graus de toxicidade quando da utilização de doses mais altas. Endossando o exposto, a NTZ, perece de mais pesquisas e mais ajustes afim de ajustar seus testes *in vivo* e *in vitro* de maneira que possa despontar como uma excelente alternativa de controle antiparasitário.

6. Referências bibliográficas

- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p. ISBN: 85-7541-015-6
- BESHAY, E. V. N. Therapeutic efficacy of Artemisia absinthium against Hymenolepis nana: in vitro and in vivo studies in comparison with the anthelmintic praziquantel. **Journal of helminthology**, 92(3), 298-308, 2018.
- BOWMAN, D. D. et al. Hookworms of dogs and cats as agents of cutaneous larva migrans. **Trends in parasitology**, v. 26, n. 4, p. 162-167, 2010. ISSN 1471-4922.
- BRAGANÇA, D. R.; QUEIROZ E. O. Manejo nutricional de cães e gatos e a inserção de alimentos alternativos na dieta de pequenos animais domiciliados no estado de Rondônia, Brasil. **Brazilian Journal of Development**. v.6, n.10, p.75090-75098, 2020.
- BRUNO, F. P.; CAIRA, M. R.; MONTI, G. A.; KASSUHA, D. E.; SPERANDEO, N. R.. Spectroscopic, thermal and X-ray structural study of the antiparasitic and antiviral drug nitazoxanide. **Journal of Molecular Structure**. v.984, n.1, p.51-57. 2010
- CAVALCANTI, J.H, L; MATOS, P.C; GOUVÊA, C.V.D; CARVALHO, W; CALVO-GUIRADO, J.L; ARAGONESES, J.M; et al. In vitro assessment of the functional dynamics of titanium with surface coating of hydroxyapatite nanoparticles. **Materials**, v.12, p.2-14, 2019.
- DAI, R. et al. Severe infection of adult dogs with helminths in Hunan Province, China poses significant public health concerns. **Veterinary Parasitology**, v. 160, n. 3-4, p. 348-350, 2009. ISSN 0304-4017.
- DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 1-25, 2014. ISSN 1756-3305.
- FAURE, L.; FOURNEL, S.; NICOLAS, C.; RIGAUT, D. A field clinical study to confirm the efficacy and safety of a metronidazole-based oral suspension in dogs naturally infested by giardiasis: comparison to fenbendazole. **Int J Appl Res Vet Med**, v.16,n.2, p.110-116. 2018.

FERREIRA, F. P. et al. Frequência de parasitas gastrointestinais em cães e gatos do município de Londrina, PR, com enfoque em saúde pública. Semina: **Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6Supl2, p. 3851-3858, 2013. ISSN 1679-0359.

FONTOURA, E. G.; FELIX, S. R.; FERNANDES, C. P. M.; GRECCO, F. B.; GONÇALVES, V. D. M.; FELIX, A. C.; NOBRE, M. O. Ensaio toxicológico do extrato aquoso de *Waltheria douradinha* (douradinha do campo) em modelo *ex vivo*. Revista da Sociedade brasileira de Ciência de animais de laboratório. 264-272, 2014.

HOLDEN, D. L.; WALKER, R.. Anthelmintic drugs and nematocides: studies in *Caenorhabditis elegans*. **WormBook: the online review of C. elegans biology**, p.1-29. 2014.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10993-1: Biological evaluation of medical devices, Part 1: Evaluation and testing**. 2003.

JARRAD, A. M.; DEBNATH, A.; MIYAMOTO, Y.; HANSFORD, K. A.; PELINGON, R.; BUTLER, M. S.; COOPER, M. A. Nitroimidazole carboxamides as antiparasitic agents targeting *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. **European journal of medicinal chemistry**. v.120, p.353-362. 2016

JENKINS, E. J. *Toxocara* spp. in dogs and cats in Canada. **Advances in Parasitology**, v. 109, p. 641-653, 2020. ISSN 0065-308X.

LOPIENSKA-BIERNAT, E.; POLAK, I.; STRYIŃSKI, R. *In vitro* effect of antiparasitic drugs on the expression of the genes code receptors: AchR and GABA in *Anisakis simplex* L3 larvae. **Annals of Parasitology**. v.62(Suppl.). 2016.

MAGNAVAL, J.-F. et al. Highlights of human toxocariasis. **The Korean journal of parasitology**, v. 39, n. 1, p. 1, 2001.

MCKENNA, P.; MCPHERSON, W.; FALCONER, G. J. Fatal ancylostomiasis in a dog. **New Zealand veterinary journal**, v. 23, n. 7, p. 151-152, 1975. ISSN 0048-0169.

MILLER, T. Influence of age and sex on susceptibility of dogs to primary infection with *Ancylostoma caninum*. **The Journal of parasitology**, p. 701-704, 1965. ISSN 0022-3395.

MOHAMED, A. S.; MOORE, G. E.; GLICKMAN, L. T. Prevalence of intestinal nematode parasitism among pet dogs in the United States (2003–2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 234, n. 5, p. 631-637, 2009.

MORAES, J.; GEARY, T. G. FDA-approved antiparasitic drugs in the 21st century: a success for helminthiasis?. **Trends in parasitology**. v.36, n.7, p.573-575, 2020.

MORTON, D.B. Guia para El punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos. *Laboratory Animals*. v.8, p. 5-12, 2005.

OECD (2002), *Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071001-en>

OECD (2018), *Test No. 452: Chronic Toxicity Studies*, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, <https://doi.org/10.1787/9789264071209-en>.

OVERGAAUW, P. A.; VAN KNAPEN, F. Veterinary and public health aspects of *Toxocara* spp. **Veterinary parasitology**. v.193, n.4, p.398-403. 2013.

PENSEL, P.; PAREDES, A.; ALBANI, C. M.; ALLEMANDI, D.; BRUNI, S. S.; PALMA, S. D.; ELISSONDO, M. C. Albendazole nanocrystals in experimental alveolar echinococcosis: enhanced chemoprophylactic and clinical efficacy in infected mice. **Veterinary parasitology**, 251, 78-84. (2018).

RAZA, A.; RAND, J.; QAMAR, A. G.; JABBAR, A.; KOPP, S. Gastrointestinal parasites in shelter dogs: occurrence, pathology, treatment and risk to shelter workers. **Animals**. v.8, n.7, p.108, 2018

REYNOSO, D.; WHITE, A. C.. Nitazoxanide. In Kucers the Use of Antibiotics: A Clinical Review of Antibacterial, Antifungal, Antiparasitic, and Antiviral Drugs, Seventh Edition. (pp. 3162-3174). (2017)CRC Press.

RUBINSKY-ELEFANT, G. et al. Human toxocariasis: diagnosis, worldwide seroprevalences and clinical expression of the systemic and ocular forms. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 104, n. 1, p. 3-23, 2010. ISSN 0003-4983.

SCHMIDT, E. et al. Changes in biochemical analytes in female dogs with subclinical *Ancylostoma* spp. infection. **BMC Veterinary Research**, v. 12, n. 1, p. 1-6, 2016. ISSN 1746-6148.

SHOMAKER, T. S.; GREEN, E. M.; YANDOW, S. M. Perspective: one health: a compelling convergence. **Academic Medicine**. v.88, n.1, p.49-55. 2013

SORIA, A. O.; HERNÁNDEZ, C. A.; YÉPEZ, M. L.; TREJO, S. P. J.; HERNÁNDEZ, L. F.; GRES, M. J.; CASTILLO, R. Synthesis and antiprotozoal activity of nitazoxanide–N-methylbenzimidazole hybrids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.23, n.24, p.6838-6841. 2013.

SOTO, M. M.; GUTIERREZ, L.; SUMANO, H.; TAPIA, G.; ALCALA-CANTO, Y.. Efficacy of nitazoxanide to treat natural *Giardia* infections in dogs. **Parasites & vectors**. v.10, n.1, p.1-9. 2017

SPAGNUOLO, P. A.; HU, J.; HURREN, R.; WANG, X.; GRONDA, M.; SUKhai, M. A.; SCHIMMER, A. D. The antihelmintic flubendazole inhibits microtubule function through a mechanism distinct from Vinca alkaloids and displays preclinical activity in leukemia and myeloma. **Blood**, v.115, n.23, 4824-4833, 2010.

SUPPLY, W. U. J. W.; PROGRAMME, S. M. Progress on sanitation and drinking water: 2015 update and MDG assessment. **World Health Organization**, 2015. ISBN 9241509147.

TRASVIÑA, M. E.; LÓPEZ, V. G.; CENTENO, P. Á.; CUETO, G. S. A., MONGE, N. F. J.; GRACIA, T. L.; GÓMEZ, G. D. Prevalence and distribution of intestinal parasites in stray dogs in the northwest area of Mexico. **Austral Journal of Veterinary Sciences**. v.49, n.2, p.105-111. 2017.

TRAVERSA, D.; OTRANTO, D. Biotechnological advances in the diagnosis of little-known parasitoses of pets. **Parasitology research**, v. 104, p. 209-216, 2009. ISSN 0932-0113.

UITERWIJK, M.; NIJSSE, R.; KOOYMAN, F. N.; WAGENAAR, J. A.; MUGHINI-GRAS, L.; PLOEGER, H. W. Host factors associated with *Giardia duodenalis* infection in dogs across multiple diagnostic tests. **Parasites & vectors**. v.12, n.1, p.1-10, 2019.

ANEXOS

ANEXO I – CERTIFICADO FAVORÁVEL COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 1

11/06/2023, 11:38

SEI/UFPel - 2208311 - Parecer



PARECER N° 109/2023/CEUA/REITORIA
PROCESSO N° 23110.010941/2023-12

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **“Pesquisa e desenvolvimento de um novo antiparasitário à base de nitazoxanida para administração oral em cães e gatos- Fase III- Testes *In vivo* – Avaliação da eficácia em cães”**, registrada com o n° 23110.010941/2023-12, sob a responsabilidade de **Sergio Jorge** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pelotas.

Finalidade	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa <input type="checkbox"/> Ensino
Vigência da autorização	Ínicio: 20/06/2023 Término: 30/12/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Canis lupus familiaris (Cão)</i>
N° de animais	60 (30 machos e 30 fêmeas)
Idade	6 meses até 10 anos
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Tutores interessados em participar do estudo.

Código para cadastro nº **CEUA 010941/2023-12**

11/06/2023, 11:38

SEI/UFPel - 2208311 - Parecer

Priscila Marques Moura de Leon

Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON, Professor do Magistério Superior**, em 07/06/2023, às 16:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2208311** e o código CRC **FF7D7C51**.

Referência: Processo nº 23110.010941/2023-12

SEI nº 2208311

ANEXO II – CERTIFICADO FAVORÁVEL COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 2

11/11/2021 16:15

SEI/UFPel - 1495505 - Parecer



PARECER N° 140/2021/CEUA/REITORIA
PROCESSO N° 23110.012204/2021-84

Certificado

Certificamos que a proposta intitulada **“Pesquisa e desenvolvimento de um novo antiparasitário à base de nitazoxanida para administração oral em cães e gatos- Fase II- Testes In vivo – Avaliação da eficácia em modelo murino”**, registrada com o n° 23110.012204/2021-84, sob a responsabilidade de **Marcia de Oliveira Nobre** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética no Uso de Animais, em reunião de 11 de novembro de 2021.

Finalidade	(x) Pesquisa	() Ensino
Vigência da autorização	Inicio = 03/01/2021	Término = 14/09/2023
Espécie/linhagem/raça	<i>Mesocricetus auratus</i> / Golden Syrian <i>Mus musculus</i> / Swiss	
Nº de animais	32 Hamsters 64 Camundongos	
Idade	Adulto	
Sexo	Machos e fêmeas	
Origem	Biotério Central - UFPel	

Código para cadastro nº **CEUA 012204/2021-84**

https://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=1691488&infra_sist... 1/2

11/11/2021 16:15

SEI/UFPEL - 1495505 - Parecer

Priscila Marques Moura de Leon

Coordenadora da CEUA



Documento assinado eletronicamente por **PRISCILA MARQUES MOURA DE LEON**, Professor do Magistério Superior/Adjunto, em 11/11/2021, às 16:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 4º, § 3º, do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufpel.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1495505** e o código CRC **0AA74A1B**.