

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 espectrofotometria. 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 projetava 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%. Concluí-se que a ação da NTZ 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. 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.