



ATIVIDADE DE ESPONJAS MARINHAS DOS GÊNEROS *Chondrosia*, *Dysidea* E *Tedania* SOB FORMAS EPIMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

Eloísa Gibin Sampiron (PIBIC/FA-UEM), Jéssica Carreira de Paula (PBC/UEM), Suzi Meneses Ribeiro (DBM/UFF), Celso Vataru Nakamura (Orientador), e-mail: cvnakamura@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/Maringá,
PR.

Área e subárea do conhecimento: Farmácia - Análise e Controle de Medicamentos

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Esponjas marinhas, Doença de Chagas.

Resumo:

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* é, ainda hoje, altamente prevalente. No entanto, os fármacos utilizados para o tratamento dessa enfermidade, benzonidazol e nifurtimox, são pouco eficazes e altamente tóxicos. Os produtos naturais, como as esponjas marinhas, tem sido muito utilizados no tratamento de diversas doenças, por suas propriedades terapêuticas. Assim, o objetivo desse estudo foi testar novos compostos a fim de se obter métodos de tratamentos que sejam mais eficazes e menos tóxicos para o hospedeiro, através do uso de extratos de esponjas marinhas dos gêneros *Chondrosia*, *Tedania* e *Dysidea*. Para isso, foram utilizados os ensaios de citotoxicidade, interação parasito-célula e antiproliferativo em formas epimastigota e amastigota. O Índice de Seletividade obtido com as formas epimastigotas mostrou que o extrato de *Dysidea avara* foi o mais eficaz, enquanto que para as formas amastigotas, *D. avara* e *T. ignis* foram as mais tóxicas para o parasito.

Introdução

Doença de Chagas é uma enfermidade causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e que, atualmente, afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo. O parasito apresenta estágios evolutivos



distintos (epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas), caracterizadas por variações morfológicas e funcionais. A forma tripomastigota, infectante, circula no sangue de vertebrados, enquanto a forma amastigota sofre multiplicação nos tecidos. As formas infectantes são eliminadas pelos vetores nas suas fezes e urina na forma de tripomastigotas metacíclicos (WHO, 2015). O tratamento da doença de Chagas ainda é limitado devido à alta toxicidade encontrada nos medicamentos, benzonidazol e o nifurtimox. Os produtos naturais são utilizados a séculos como forma de tratamento para diversas enfermidades, principalmente doenças infecciosas (IZUMI et al., 2011). Dentre os diversos grupos de produtos naturais, estão as esponjas marinhas. Elas apresentam grande potencial terapêutico, visto que possuem diversos metabólitos secundários, mostrando atividade biológica como: anti-inflamatório, anticâncer, antiprotozoário, antifúngica e antiviral (MEHBUB et al., 2014). Levando-se em conta a grande importância da descoberta de novos fármacos, mais eficazes e menos tóxicos, o projeto buscou encontrar métodos mais eficazes contra a zoonose parasitária, utilizando esponjas marinhas dos gêneros *Chondrosia*, *Tedania* e *Dysidea*, coletadas na costa marinha brasileira e espanhola.

Materiais e métodos

Ensaio antiproliferativo em epimastigota

Uma suspensão de parasitos foi preparada através da adição de formas epimastigotas de *T. cruzi* (1×10^6 parasitos/mL), 10% de SFB, meio de cultura LIT e antibiótico. O IC_{50} (concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento) do composto das esponjas foi determinado através da média dos três experimentos. Os extratos das esponjas marinhas dos gêneros *Chondrosia*, *Tedania* e *Dysidea* foram dissolvidos em eppendorf com dimetilsulfóxido (DMSO) e meio LIT, na concentração de 1000, 500, 100, 50 e 10 $\mu\text{g/mL}$. Foram distribuídos nos poços da placa de 24 poços, 100 μL de cada diluição do composto das esponjas e 900 μL da suspensão do parasito. Para o controle foi adicionado 100 μL do meio LIT e 900 μL do pool de células. A placa foi incubada a 28 °C por 96 h. Para a leitura do experimento, o conteúdo do poço foi diluído em formalina (3%), a contagem realizada em câmara de Neubauer e os resultados expressos como a porcentagem de inibição em relação ao controle. O IC_{50} foi determinado por análise de regressão logarítmica dos dados obtidos. Realizou-se o teste em duplicata e o experimento foi repetido no mínimo três vezes.

Ensaio de citotoxicidade

Foram utilizadas células de linhagem contínua LLCMK₂ (Célula epitelial de rim de *Macaca mulata*), cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB a 37°C em estufa com tensão de 5% de CO₂. Para o cultivo utilizou-



se garrafas de plástico com tampas de rosca com dispositivo para a entrada do CO₂. Para o ensaio de citotoxicidade, após a formação da monocamada celular, as células foram tripsinizadas a 37 °C por 1 min e ressuspensas. Foram usados 100 µL de célula LLCMK₂ (2,5 x 10⁵ células/mL), que foram distribuídos em placas estéreis de 96 poços, por um período de incubação de 96 h, com atmosfera de 5% de CO₂. Em 24 h obteve-se uma monocamada, que foi tratada com os extratos de *Chondrosia*, *Tedania* e *Dysidea*, previamente solubilizados com DMSO e meio DMEM, nas concentrações de 1000, 500, 100, 50 e 10 µg/mL. A toxicidade dos extratos foi avaliada pela leitura revelada pelo MTT.

Interação Parasito-célula

Foi realizada a desagregação do tapete de células LLCMK₂ com tripsina e a contagem na câmara de Neubauer. A suspensão foi preparada com um inóculo de 2,5x10⁵ cél/mL, 10% de SFB, antibiótico e DMEM. Em uma placa de 24 poços colocou-se as lamínulas, 1 mL da suspensão e incubou-se por 24 h. Após isso, foi preparada a suspensão de parasitos, os quais foram centrifugados e ressuspensos em DMEM. Retirou-se então o meio e adicionou-se 1 mL da suspensão de parasitos. Incubou-se a 37°C à 5% de CO₂ por 24 h. O meio, contendo parasitos não internalizados foi retirado e lavou-se os poços duas vezes com PBS. A solução estoque de 10 µg/mL foi preparada e diluída em DMSO e DMEM na concentração de 1000, 500, 100, 50 e 10 µg/mL. Os extratos foram adicionados, incubou-se por 96 h e após esse período realizou-se a coloração. Para a coloração, removeu-se meio de cada poço e lavou-se duas vezes com PBS. Adicionou-se 1 mL por poço de metanol por 10 min. Removeu-se o metanol e adicionou-se 1 mL por poço de Giemsa por 15 min. Removeu-se o Giemsa e lavou-se com água destilada. As lamínulas foram então postas em papel filtro para a secagem e em seguida as lâminas foram montadas utilizando Permount.

Resultados e Discussão

Com os resultados obtidos para o ensaio antiproliferativo foi possível determinar os IC₅₀ e IC₉₀, ou seja, as concentrações necessárias para inibir 50 e 90% do crescimento dos parasitos. Para o extrato da *C. reniformes* os resultados obtidos para os IC₅₀ e IC₉₀, respectivamente, foram de 22,85 µg/mL e 44,4 µg/mL. Para a *D. avara* foram de 25,57 µg/mL e 49,76 µg/mL. Enquanto que, para o extrato bruto de *T. ignis*, os resultados foram de 124,71 µg/mL e 224,47 µg/mL. Com o ensaio de citotoxicidade foi possível encontrar os valores correspondentes ao CC₅₀, ou seja, concentração necessária para inibir 50% da proliferação celular. Para a *C. reniformes* o CC₅₀ foi de 72,9 µg/mL e para *T. ignis* 29,32 µg/mL. O extrato de *D. avara* foi o que apresentou menor toxicidade 144,2 µg/mL.



O índice de seletividade (IS), consiste na razão entre a concentração citotóxica 50% (CC₅₀) para células LLCMK₂ e IC₅₀ para protozoários. Os resultados obtidos mostram que o IS para epimastigotas obtido para a *C. reniformes* foi de 3,19, ou seja, a substância é três vezes mais tóxica para o parasito do que para as células hospedeiras; enquanto que o IS para amastigotas foi de 0,88, demonstrando que o extrato é bastante tóxico. Para *D. avara*, o IS foi equivalente à 7,36, no qual pode-se inferir que o extrato é sete vezes mais tóxico para o *T. cruzi* do que para a célula; já para as formas amastigotas, o extrato se mostrou 3,57 vezes mais tóxico para o parasito do que para as células mamíferas. Para *T. ignis*, o valor encontrado foi de 0,23, portanto esse extrato é tóxico para as células hospedeiras; enquanto que o IS de 4,0 para as formas amastigotas, mostra que o extrato é mais tóxico para esta forma, quando comparado às formas epimastigotas.

Conclusões

Pode-se concluir que, dentre todos os extratos de esponjas marinhas testadas, o mais eficaz para as formas epimastigotas do parasito seria a *D. avara* por apresentar mais toxicidade ao parasito do que para as células de mamíferos. Já para as formas amastigotas de *T. cruzi*, a *D. avara* e a *T. ignis* são as mais tóxicas.

Agradecimentos

CNPq; Capes; Fundação Araucária e Universidade Estadual de Maringá.

Referências

- IZUMI, E.; NAKAMURA, T. U.; FILHO, B. P. D.; JUNIOR, V. F. V.; NAKAMURA, C. V. **Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against Trypanosoma cruzi.** Nat. Prod. Rep., 28, 809. 2011.
- MEHBUB, M.F., LEI, J., FRANCO, C., ZHANG, W., **Marine sponge derived natural products between 2001 and 2010: trends and opportunities for discovery of bioactives.** Marine drugs 12, 4539-4577. 2014.
- WORLD HEART ORGANIZATION. **World Health Organization, Chagas disease (American trypanosomiasis),** 2015.