



## ESTUDO DOS EFEITOS DE CHALCONAS EM *Trypanosoma cruzi*

Eloísa Gibin Sampiron (PIBIC/FA-UEM), Juliana Cogo (PCF/UEM), 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*, Doença de Chagas, Chalconas

### Resumo:

Doença de Chagas, doença crônica parasitária, causada pelo *Trypanosoma cruzi* afeta de 6 a 7 milhões de pessoas, especialmente na América Latina. O tratamento atualmente é feito com os fármacos de escolha benzonidazol e nifurtimox. No entanto, ambos apresentam alto nível de toxicidade para as células do hospedeiro, causam sérios efeitos colaterais e tem ação pouco eficaz na fase crônica da doença. Dessa forma é essencial a busca por novos compostos, cuja atividade tripanocida e toxicidade sejam mais satisfatórios do que os medicamentos hoje disponíveis. Sendo assim, o objetivo dessa pesquisa foi avaliar o potencial antiprotozoário de chalconas sob formas tripomastigotas, epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*. Para isso, foram utilizados ensaios de citotoxicidade, interação parasito-célula, viabilidade e antiproliferativo, com os quais foi possível se obter o índice de seletividade (IS). Os IS obtidos mostram que dentre os compostos testados, as substâncias LV02 e LV04 foram os mais eficazes.

### Introdução

Doença de Chagas, enfermidade causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, atualmente afeta cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo. O parasito apresenta estágios evolutivos (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. Já as formas epimastigotas são aquelas encontradas no trato digestivo do vetor (WHO, 2015). Devido à alta toxicidade que os medicamentos causam e levando-se em conta o sério problema de saúde pública que a doença de Chagas representa, é essencial a busca por novos compostos, cuja atividade tripanocida e toxicidade sejam mais satisfatórios do que os medicamentos hoje disponíveis (VALDEZ et al., 2012). As chalconas são uma das classes de inibidores da enzima cruzaina, conhecida por ser a principal cisteína protease do *T. cruzi* e estar envolvida no desenvolvimento, nutrição do parasito e na evasão do sistema imune do hospedeiro (SOUZA et al., 2012). Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o potencial anti-protozoário *in vitro* de chalconas sobre o *T. cruzi*.

## Materiais e Métodos

### *Ensaio antiproliferativo em epimastigota*

Suspensão de parasitos foi preparada através da adição de formas epimastigotas ( $1 \times 10^6$  parasitos/mL), 10% de Soro fetal bovino (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 derivados nas concentrações de 1000, 500, 100, 50 e 10  $\mu\text{g/mL}$ , foram distribuídos nos poços da placa de 24 poços, sendo 100  $\mu\text{L}$  de cada diluição do composto das esponjas e 900  $\mu\text{L}$  da suspensão do parasito. A placa foi incubada a  $28^\circ\text{C}$  por 96 h. A contagem foi realizada em câmara de Neubauer. O  $IC_{50}$  foi determinado por regressão logarítmica dos dados obtidos. Realizou-se o teste em duplicata e o experimento foi repetido no mínimo três vezes.

### *Avaliação da atividade tripanocida in vitro*

Formas tripomastigotas obtidas da infecção de cultura de células LLCMK<sub>2</sub> foram obtidas no pico parasitêmico. Em seguida, a suspensão de parasitos ( $1,0 \times 10^7$  parasitos/mL) foi adicionada em placas de 96 poços e incubada por 24 h a  $37^\circ\text{C}$ , na presença de diferentes concentrações dos derivados. Os resultados foram expressos através da observação da motilidade que determinou a viabilidade dos parasitas. A concentração capaz de provocar lise de 50% dos protozoários ( $EC_{50}$ ) foi calculada por análise de regressão linear.





### *Interação Parasito-célula*

Em uma placa de 24 poços colocou-se as lamínulas, 1 mL da suspensão de células LLCMK<sub>2</sub> ( $2,5 \times 10^5$  cél/mL) e incubou-se por 24 h. Após isso, foi preparada a suspensão de parasitos, os quais foram centrifugados e ressuspendidos em DMEM. Retirou-se então o meio e adicionou-se 1 mL da suspensão de parasitos. Incubou-se a 37°C à 5% de CO<sub>2</sub> por 24 h. O meio, contendo parasitos não internalizados foi retirado e lavou-se os poços com PBS. As drogas, nas concentrações 1000, 500, 100, 50 e 10 µg/mL, foram adicionadas, incubou-se por 96 h e após esse período realizou-se a coloração. Para isso, adicionou-se 1 mL por poço de metanol por 10 min, que então foi substituído por 1 mL por poço de Giemsa por 15 min. As lamínulas foram secadas e as lâminas montadas utilizando Permount

### *Ensaio de citotoxicidade*

Foram utilizadas células LLCMK<sub>2</sub> (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 CO<sub>2</sub>. Para o cultivo utilizou-se garrafas de plástico com tampas de rosca com dispositivo para a entrada do CO<sub>2</sub>. Após a formação da monocamada celular, as células foram tripsinizadas a 37 °C e ressuspendidas. As células a uma concentração de  $2,5 \times 10^5$  células/mL, foram distribuídos em placas estéreis de 96 poços, por 96 h com 5% de CO<sub>2</sub>. Em 24 h obteve-se uma monocamada celular, que foi tratada com os derivados, nas concentrações de 1000, 500, 100, 50 e 10 µg/mL. A toxicidade da droga foi avaliada pela leitura revelada pelo MTT.

## **Resultados e Discussão**

Para as formas epimastigotas, os compostos apresentaram atividade entre 17,5 e 83,65 µM. As melhores atividades foram observadas nos compostos LV02, LV04, LV05 e LV09, que apresentaram valores de IC<sub>50</sub> entre 17,5 e 25,5 µM. Os demais derivados possuem atividade em concentrações mais altas. Já para as formas tripomastigotas, o único derivado que apresentou atividade foi o LV02, cujo EC<sub>50</sub> foi de 73,15 µM.

Para o ensaio de interação parasito-célula os derivados apresentaram atividade entre 19,38 e 51,09 µM. Dentre esses, as substâncias que apresentaram melhor atividade foram LV09 e LV10, cujos IC<sub>50</sub> correspondem a 19,38 e 26,29, respectivamente. Já os outros derivados apresentaram IC<sub>50</sub> entre 41,95 e 51,09 µM, podendo-se inferir





que possuem atividade em concentrações mais altas, sendo menos eficazes.

Para o ensaio de citotoxicidade os derivados apresentaram atividade entre 16,78 e 327,19  $\mu\text{M}$ , sendo que aqueles que apresentaram menor toxicidade foram LV06 e LV08, com  $\text{CC}_{50}$  equivalentes à 327,19 e 247,69  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

O índice de seletividade (IS) consiste na razão entre o  $\text{CC}_{50}$  para células LLCMK<sub>2</sub> e o  $\text{IC}_{50}/\text{EC}_{50}$  para protozoários. Os resultados mostram que para a forma epimastigota, os melhores IS foram obtidos com as substâncias LV02 e LV04, e foram correspondentes à 7,98 e 12,16, respectivamente. Quanto as formas amastigotas, o derivado LV04, cujo IS foi equivalente à 6,54, foi a substância mais eficaz, enquanto LV02, LV05 e LV10 apresentaram IS intermediário. Para as formas tripomastigotas, a substância LV02 foi a mais seletiva, sendo que o IS obtido foi de 1,90.

### Conclusões

Os compostos apresentaram atividade contra as três formas evolutivas. No entanto, os derivados apresentam uma maior atividade contra as formas epimastigotas e amastigotas quando em comparação com as formas tripomastigotas, o que sugere que esses compostos atuam no processo de replicação do parasito.

### Agradecimentos

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

### Referências

SOUZA, M. L. 2012. **Identificação de novos inibidores da enzimas cruzaina de Trypanosoma cruzi candidatos à fármacos contra a doença de Chagas.** Universidade de São Paulo

VALDEZ, R.H.; TONIN, L.T.; UEDA-NAKAMURA, T.; SILVA, S.O.; DIAS FILHO, B.P.; KANESHIMA, E.N.; YAMADA-OGATTA, S.F.; YAMAUCHI, L.M.; SARRAGIOTTO, M.H.; NAKAMURA, C.V. 2012. **In vitro and in vivo trypanocidal synergistic activity of N-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro-beta-carboline-3-carboxamide associated with benznidazole.** Antimicrobial agents and chemotherapy 56, 507-512.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization, Chagas disease (American trypanosomiasis).** 2015.

