

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE E DO POSSÍVEL MECANISMO DE AÇÃO DO DERIVADO DE QUINOXALINA LSPN395 FRENTE AS FORMAS EVOLUTIVAS DE *Trypanosoma cruzi*

Leonardo Henrique Micheletti Sotocorno (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Jéssica Carreira de Paula (PBC/UEM), Juliana Cogo, Celso Vataru Nakamura (Orientador), e-mail: leo.henrim@hotmail.com.

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

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

Palavras-chave: Doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, quinoxalinas

Resumo:

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e atinge cerca de 7 milhões de pessoas. O tratamento atual é realizado apenas com dois fármacos, o benzonidazol e o nifurtimox, que apresentam alta toxicidade e muitos efeitos colaterais. Os derivados de quinoxalina tem sido muito utilizados no tratamento de diversas doenças, assim o objetivo desse estudo foi analisar um derivado, o LSPN395, a fim de obter métodos de tratamentos que sejam mais eficazes e menos tóxicos para os usuários. Para isso, foram utilizados ensaios antiproliferativos, de citotoxicidade e para a análise do possível mecanismo de ação. Os protozoários tratados foram submetidos à microscopia eletrônica de transmissão e varredura, onde foi possível a visualização de alterações nas membranas e em organelas importantes desses micro-organismos. Já os resultados dos ensaios permitiram o cálculo do índice de seletividade do LSPN395, que apresentou resultados satisfatórios frente as formas evolutivas do protozoário *T. cruzi*.

Introdução

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi* (NEVES et al., 2005). Estima-se que haja de 6 a 7 milhões de pessoas infectadas no mundo, com uma incidência anual de 28 mil casos nas Américas, provocando em média, 12 mil mortes por ano (WHO, 2016). O tratamento desta doença é realizado com dois fármacos, o nifurtimox e o benzonidazol (WHO, 2016).

Recentemente, foi divulgada a atividade de um derivado da quinoxalina contra o protozoário *T. cruzi*, apresentando um sinergismo com o benzonidazol no combate as formas tripomastigotas e epimastigotas

(RODRIGUES et al., 2014). A quinoxalina e seus derivados apresentam inúmeras atividades biológicas, como: anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, antifúngica e antiviral.

Devido a alta toxicidade apresentada pelos medicamentos disponíveis e pelo grande problema de saúde pública que a doença de Chagas representa, torna-se necessário a procura por compostos que apresentem menor toxicidade e melhor eficácia no combate ao *T. cruzi* (VALDEZ et al., 2012). Dessa forma, objetivou-se avaliar a atividade de um derivado de quinoxalina, o LSPN395, frente as formas epimastigota, tripomastigota e amastigota, assim como, investigar o seu possível mecanismo de ação.

Materiais e métodos

Os ensaios foram realizados com a cepa Y do protozoário *T. cruzi*. Para a avaliação antiproliferativa, formas epimastigotas foram tratadas com o composto LSPN395 em concentrações de 0,1 a 100 μM e incubadas à 28° C por 96 h e a leitura foi feita através do método XTT/PMS. Para a determinação da viabilidade em formas tripomastigotas (IC_{50}), as células foram adicionadas em placas de 96 poços e tratadas em concentrações crescentes do composto LSPN 395 e incubadas à 37° C por 24 h. Para a avaliação antiproliferativa em amastigotas intracelulares, células LLCMK₂ foram plaqueadas em lamínulas redondas e após 24 h foram infectadas e incubadas novamente à 37° C por 24 h. Após a infecção foi realizado o tratamento por 96 h com o composto LSPN395 em concentrações crescentes. Para a contagem as lamínulas foram fixadas em metanol, coradas em Giemsa e por fim analisadas a quantidade de células infectadas e quantidade de amastigotas por célula. Com o intuito de analisar a citotoxicidade do composto, células LLCMK₂ foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas à 37° C por 24 h. Após foi realizado o tratamento com o composto em concentrações crescente e incubadas sob as mesmas condições por 96 h. O CC_{50} , foi determinado através do método de MTT.

Após a determinação do IC_{50} para as três formas do *T. cruzi*, foi iniciado os experimentos de mecanismo de ação. Para isso, formas epimastigotas foram tratadas com a concentração do IC_{50} e processadas para microscopia eletrônica de varredura e transmissão e para ensaios bioquímicos. Para a microscopia eletrônica os protozoários foram fixados em tampão cacodilato de sódio e glutaraldeído 2,5%. Para a microscopia eletrônica de transmissão as amostras foram desidratadas em acetona e incluídas em resina EPON. Após foram realizados cortes ultrafinos e por fim contrastadas e visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JM 1400). Para a microscopia eletrônica de varredura, as amostras foram desidratadas em álcool submetidas ao ponto crítico, metalizadas e observadas no microscópio de varredura (FEI QUANTA 250).

Para os ensaios bioquímicos as amostras foram tratadas e marcadas com H₂DCFDA para quantificar a espécies reativas de oxigênio (ERO's) total, DPPP para quantificar a peroxidação lipídica, iodeto de propídeo para

avaliar a integridade de membrana e vermelho do Nilo para avaliar a presença de corpos lipídicos.

Resultados e Discussão

Foram determinados a concentração inibitória de 50% das formas epimastigota e amastigota de *T. cruzi*. Para as formas tripomastigota foi possível determinar a concentração efetiva para 50% de protozoários e para células LLCMK₂ foi determinado a concentração citotóxica para 50% das células. Com esses valores foi possível calcular o índice de seletividade para todas as formas do protozoário como segue na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade *in vitro* do derivado de quinoxalina LSPN395 frente ao protozoário *Trypanosoma cruzi*.

	Citotoxicidade LLCMK ₂ /96h	Epimastigota IC ₅₀ /96h	IS	Tripomastigota EC ₅₀ /24h	IS	Amastigota IC ₅₀ /96h	IS
LSPN 395	78,6 ± 5,1	1,8 ± 0,4	43,7	10,2 ± 2,4	7,7	6,2 ± 0,8	12,7

Os resultados foram expressos em µM, média ± desvio padrão. O índice de seletividade (IS) foi obtido através da equação: $IS = CC_{50}/IC_{50}$.

A microscopia eletrônica de varredura mostrou arredondamento, com alterações no tamanho do flagelo e na membrana plasmática e bem como o rompimento da mesma (Figura 1).

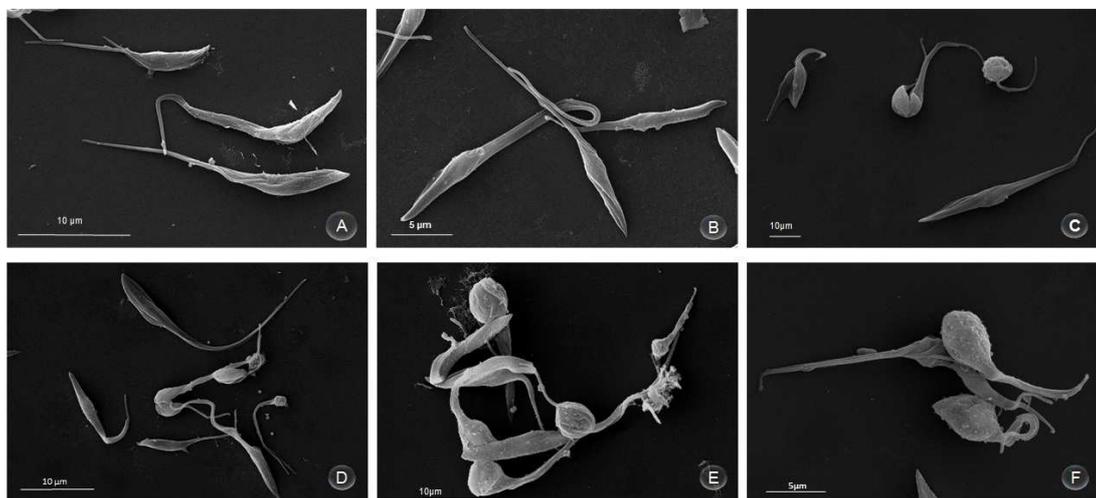


Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura de epimastigota de *Trypanosoma cruzi* tratada por 96 h. Controle (A e B); Células tratadas com o IC₅₀ de LSPN395 (C e D); Células tratadas com IC₉₀ de LSPN395 (E e F).

A microscopia eletrônica de transmissão evidenciou células com acúmulo de corpos lipídicos, presença de vacúolos autofágicos, alterações nucleares, do complexo de Golgi e das mitocôndrias (Figura 2). Os ensaios bioquímicos mostram que ocorreu alterações na integridade de membrana

(PI). Porém, não ocorreu alterações na produção de espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica. Dessa forma, as alterações observadas na microscopia e ensaios bioquímicos não são provocadas primariamente pela ERO's.

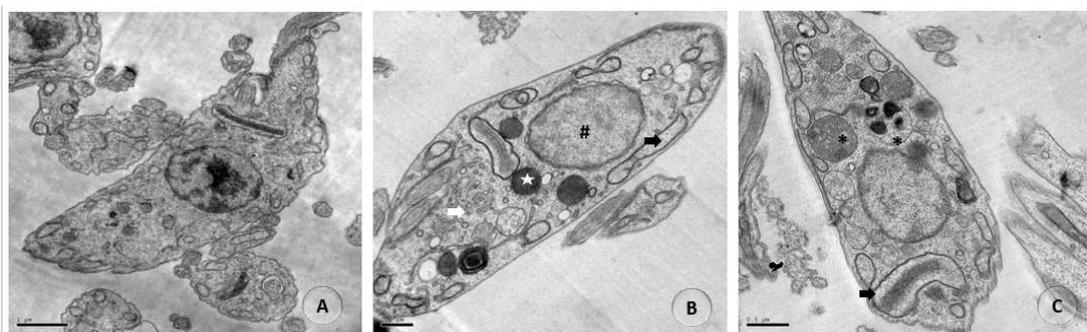


Figura 2 – Microscopia Eletrônica de Transmissão de epimastigota de *T. cruzi*. Controle (A); Tratado com IC₅₀ de LSPN395 (B e C). Vacúolo autofágico (asterisco); Corpos lipídicos (estrela); Alteração nuclear (#); Alteração no complexo de Golgi (seta branca) e alteração mitocondrial (seta preta).

Conclusões

Com os resultados obtidos, podemos concluir que o composto LSPN395 é eficaz contra as principais formas evolutivas do protozoário, apresentando índice de seletividade promissor. A microscopia eletrônica e os ensaios bioquímicos evidenciou alterações, das quais, podemos sugerir que a droga esteja agindo em vias autofágicas ou apoptóticas.

Agradecimentos

CNPq, Fundação Araucária, Universidade Estadual de Maringá e Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos.

Referências

RODRIGUES, J. H. et al. **A quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone or in combination with benznidazole, against *Trypanosoma cruzi***. PLoS ONE, v. 9, n. 1, p. 85706, 2014.

VALDEZ, R. H. et al. **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, v. 56, n. 1, p. 507-12, Jan 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **World Health Organization, Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2016.