

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS CARREGADAS COM QUINOXALINA-4 EM FORMAS EPIMASTIGOTAS *Trypanosoma cruzi*

Nathalia Miranda (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Hélio Volpato, Marcos Luciano Bruschi, Celso Vataru Nakamura (Orientador), e-mail: cvnakamura@gmail.com

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

Ciências Biológicas/ Farmácia

Palavras-chave: doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, nanopartículas.

Resumo:

A doença de Chagas é considerada uma doença negligenciada e os fármacos disponíveis causam danos nocivos ao organismo devido sua alta toxicidade. Diante disso, em estudos recentes pelo nosso grupo de pesquisa, as quinoxalinas têm se destacado como uma nova substância anti-*Trypanosoma*, sendo elas encapsuladas em nanopartículas lipídicas sólidas. Sendo assim, no presente estudo, foram desenvolvidas novas nanopartículas carregadas com o composto, as quais resultaram em uma promissora atividade, sendo está relacionada com alteração na permeabilidade da membrana plasmática acompanhada de alteração no potencial de membrana mitocondrial e no metabolismo redox do parasito.

Introdução

A doença de Chagas, transmitida pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* é uma enfermidade que afeta cerca de 6-7 milhões de pessoas no mundo, principalmente na América Latina. O tratamento disponível é restrito apenas dois fármacos, o benzonidazol e o nifurtimox. Porém, ambos apresentam uma alta toxicidade que pode ser expressa em uma variedade de sérios efeitos colaterais. Diante dessas limitações, novos estudos têm sido realizados a fim de buscar um novo composto anti-*Trypanosoma*, e entre eles, o grupo das quinoxalinas têm se destacado. Estudos recentes em nosso laboratório demonstraram a atividade promissora da quinoxalina-4 sobre todas as formas parasitárias de *T. cruzi* em estudos *in vitro*. Entretanto, foi verificado uma diminuição da atividade em ensaios realizados com tripomastigotas sanguíneas. Atualmente, os estudos de encapsulamento com nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) vem destacando-se devido suas propriedades sucessoras: lipídios biocompatíveis e biodegradáveis, com baixa ou nenhuma toxicidade, podendo funcionar como excelentes sistemas de liberação de fármacos. Com isso, tentando reverter à problemática, estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram sucesso na encapsulação da quinoxalina em NLS e em conjunto uma atividade promissora sobre formas tripomastigotas

sanguíneas. Portanto, devido ao êxito dos resultados obtidos, o presente estudo teve como objetivo avaliar o mecanismo de ação de nanopartículas lipídicas contendo composto sintético quinoxalina-4 em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Materiais e métodos

Parasitas. Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) foram cultivadas em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e mantidas a 28°C.

Tratamento. Formas epimastigotas (1×10^6 parasitos/mL) foram tratadas com a concentração de quinoxalina-4 1,46 e 3 μM da formulação E, e 4,39 e 9 μM da formulação F.

Análise morfológica. Após o tratamento por 96 h, os parasitos foram lavados com PBS, fixados em glutaraldeído (2,5%) em tampão cacodilato (0,1 M), aderidos em poli-L-lisina, lavados em tampão cacodilato (0,1 M), desidratados em etanol (concentrações crescentes), submetidos ao ponto crítico (substituição do etanol com CO_2) e metalizados com ouro. As imagens foram capturadas em microscópio eletrônico de varredura Shimadzu SS-550.

Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Após tratamento por 24 h, os parasitos foram lavados com PBS, incubados com H_2DCFDA (10 μM) por 45 min, por 45 min, adicionados em placa preta de 96 poços e realizado leitura da fluorescência em leitor de microplacas (Victor X3; PerkinElmer). H_2O_2 (100 μM) foi usado como controle positivo.

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial. Após tratamento por 24 h, os parasitos foram lavados com tampão salina (0,9%), marcados com rodamina 123 por 30 min, lavados com tampão salina e incubados por 15 min. Em seguida, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur e software CellQuest no total de 10.000 eventos. CCCP (100 μM) foi usado como controle positivo.

Análise do volume celular. Após tratamento por 24 h, os parasitos foram lavados com PBS e realizado análise em citômetro de fluxo FACSCalibur e software CellQuest no total de 10.000 eventos. Actinomicina D (1 mM) foi usado como controle positivo.

Análise da integridade da membrana plasmática. Após tratamento por 24 h, os parasitos foram lavados com PBS, marcados com iodeto de propídio (0,2 $\mu\text{g/mL}$) por 5 min e em seguida analisadas em citômetro de fluxo FACSCalibur e software CellQuest no total de 10.000 eventos. Digitonina (40 μM) foi usado como controle positivo.

Resultados e Discussão

Através da microscopia eletrônica de varredura, foi possível verificar consideráveis alterações morfológicas dos parasitos tratados em

comparação ao controle (Figura 01 A-B). A formulação E causou alteração principalmente no tamanho dos flagelos e arredondamento do corpo dos parasitos (Figura 01 C-E). Nas formas epimastigotas tratadas com a formulação F, foi possível observar principalmente alterações no corpo celular, sendo predominantemente verificado um arredondamento do corpo celular (Figura 01 D-F). Por meio da marcação com H₂DCFDA, verificamos um aumento significativo dos níveis de ERO dos parasitos tratados com ambas as formulações em comparação com o controle não tratado (Figura 02). Em metodologias analisadas por citometria de fluxo, constatamos que o composto provocou diminuição do potencial da membrana mitocondrial, redução do volume celular (Figura 03) e alteração na integridade da membrana plasmática (Figura 04). Ambos os resultados foram dose-dependente. Esses resultados sugerem que o composto sintético quinoxalina-4 provoca alterações que culmina em morte celular por necrose devido à presença de alterações na membrana plasmática, acompanhado por alteração no metabolismo redox via mitocôndria no parasito.

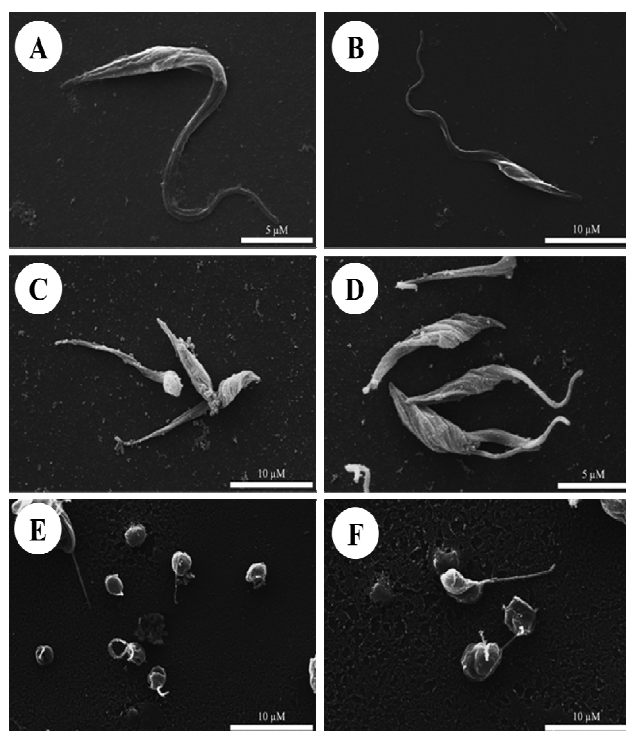


Figura 01. Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (A-B) parasitos não tratados, (C-E) tratados com 1,46 e 3 µM de quinoxalina-4 na formulação E, respectivamente e (D-F) tratados com 4,39 e 9 µM de quinoxalina-4 na formulação F, respectivamente.

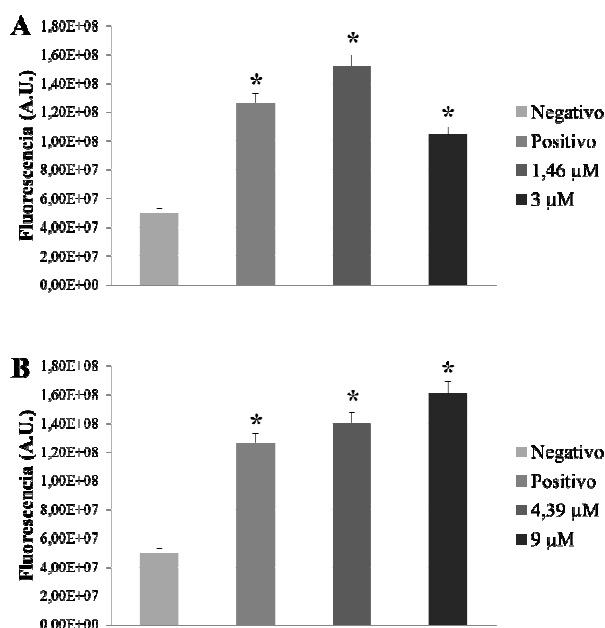


Figura 02. Avaliação dos níveis de espécies reativas de oxigênio em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (A) parasitos tratados com a formulação E e (B) parasitos tratados com a formulação F. Dados são expressos através da média ± desvio padrão de três experimentos independentes.

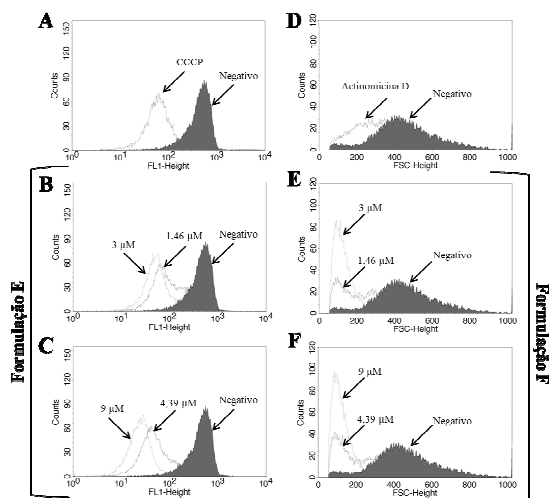


Figura 03. Avaliação do potencial da membrana mitocondrial e análise do volume celular em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Potencial da membrana mitocondrial: (A) controle negativo e positivo, (B) formulação E e (C) formulação F. Volume celular: (D) controle negativo e positivo, (E) formulação E e (F) formulação F.

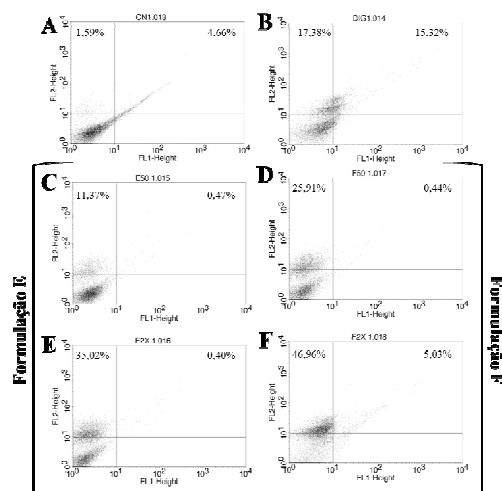


Figura 04. Avaliação da integridade da membrana plasmática em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. (A) controle negativo, (B) controle positivo, (C-E) formulação E: 1,46 e 3 μ M de quinoxalina-4, respectivamente e (D-F) formulação F: 4,39 e 9 μ M de quinoxalina-4, respectivamente.

Conclusões

Podemos concluir que o composto quinoxalina-4 possui atividade em formas epimastigotas de *T. cruzi* mesmo apresentando-se carregado em partículas lipídicas sólidas, sendo essa atividade relacionada com alteração na permeabilidade da membrana plasmática, uma característica de morte celular por necrose, acompanhada de alteração no metabolismo redox do parasito. Novos estudos *in vitro* devem ser realizados a fim de determinar de forma mais precisa o mecanismo de ação do composto frente as formas parasitárias de *T. cruzi*, bem como estudos *in vivo* na busca de um novo fármaco para o tratamento de pacientes com doença de Chagas.

Agradecimentos

Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosmético –UEM, CNPq, Fundação Araucária.

Referências

- WHO | **Chagas disease** (American trypanosomiasis). WHO, 2017.
- ISHIKAWA, H. et al. **Synthesis and antimicrobial activity of 2,3-bis(bromomethyl)quinoxaline derivatives**. *Bioorganic Chemistry*, v. 41–42, p. 1–5, abr. 2012.
- RODRIGUES, J. H. DA S. et al. **A Quinoxaline Derivative as a Potent Chemotherapeutic Agent, Alone or in Combination with Benznidazole, against *Trypanosoma cruzi***. *PLoS ONE*, v. 9, n. p.e85706, 17 jan. 2014.