

## ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E MECANISMO DE AÇÃO DA DIBENZILIDENOACETONA A11K3 FRENTE A EPIMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *Trypanosoma cruzi*

Amanda Beatriz Kawano Bakoshi (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Jéssica Carreira de Paula (Co-orientadora), Tânia Ueda Nakamura, Danielle Lazarin-Bidóia (Co-orientadora), Celso Vataru Nakamura (Orientador), e-mail: amandabakoshi@gmail.com

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

### Ciências Biológicas III / Microbiologia Aplicada

**Palavras-chave:** doença de Chagas, dibenzilidenoacetona, morte celular.

#### Resumo:

A doença de Chagas é causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e afeta milhões de pessoas pelo mundo. Apesar disso, o tratamento utilizado causa diversos efeitos colaterais aos pacientes, tornando necessária a busca por novos compostos para o tratamento da doença. Desta forma, o presente estudo buscou avaliar a atividade da dibenzilidenoacetona **A11K3** contra *T. cruzi*. A atividade do composto foi comprovada contra epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do protozoário, e foi verificado que **A11K3** não exibiu toxicidade frente células LLC-MK2. Constatou-se que epimastigotas tratadas com **A11K3** apresentaram alterações morfológicas e ultraestruturais. Testes bioquímicos revelaram que **A11K3** induz o aumento de espécies reativas de oxigênio, de níveis de tióis reduzidos e vacúolos autofágicos, e também causa ruptura de membrana celular em epimastigotas. Já em amastigotas, o composto promove diminuição dos níveis de espécies reativas de oxigênio e acúmulo de corpos lipídicos. Sendo assim, **A11K3** possui atividade contra *T. cruzi*, e promove alterações no protozoário que levam à morte celular.

#### Introdução

A doença de Chagas é uma doença negligenciada causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Possui alta taxa de incidência, afetando milhões de pessoas; é endêmica na América Latina, mas vem se espalhando por outras regiões não endêmicas por meio da migração (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Os medicamentos utilizados no tratamento da doença são o Nifurtimox e o Benznidazol, os quais podem promover efeitos colaterais aos pacientes (COURA; DE CASTRO, 2002), tornando a busca por novos fármacos contra a doença de Chagas necessária, visando um tratamento com diminuição dos efeitos colaterais e maior eficácia na fase crônica dessa doença.

Dibenzilidenoacetona (DBAs) são uma classe de compostos que possuem uma dienona acíclica ligada a grupos arila nas duas posições beta, sendo que estudos realizados com estes compostos já demonstraram atividade anti-*T. cruzi* (LAZARIN-BIDÓIA *et al.*, 2015). Com isso, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade e

mecanismo de ação da DBA **A11K3** frente a epimastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*.

## Materiais e métodos

Os experimentos foram feitos com a cepa Y de *T. cruzi*, e o tratamento realizado com concentrações crescentes de **A11K3**. Para determinação da atividade antiproliferativa em epimastigotas, células foram tratadas por 96 h, e a leitura realizada pelo método XTT/PMS, determinando a concentração inibitória de 50% dos parasitos ( $IC_{50}$ ). Para avaliar a viabilidade de tripomastigotas, células foram tratadas por 24 h e contadas em microscópio óptico, determinando a concentração efetiva em 50% ( $EC_{50}$ ). Para avaliação da atividade antiproliferativa em amastigotas intracelulares, células LLC-MK2 foram infectadas com tripomastigotas e tratadas por 96 h, fixadas e coradas com Giemsa, analisadas em microscópio óptico e calculou-se o valor de  $IC_{50}$ . A citotoxicidade de **A11K3** foi avaliada em células LLC-MK2 tratadas por 96 h; a leitura foi realizada pelo método de MTT, e a concentração citotóxica em 50% ( $CC_{50}$ ) foi estabelecida.

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), epimastigotas foram tratadas com  $IC_{50}$  e  $2 \times IC_{50}$  de **A11K3** por 24 h e 96 h e fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% e tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Depois, as células foram desidratadas em etanol, submetidas ao ponto crítico, metalizadas e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura. Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), epimastigotas foram tratadas e fixadas conforme descrito para MEV, e pós-fixadas, desidratadas em acetona e incluídas em resina EPON. Cortes ultrafinos foram obtidos, contrastados, e visualizados em microscópio eletrônico de transmissão.

Para os ensaios bioquímicos, epimastigotas tratadas por 24 h foram incubadas com monodansilcadaverina (MDC),  $H_2DCFDA$ , iodeto de propídio e DTNB para avaliação de vacúolos autofágicos, espécies reativas de oxigênio (EROs), integridade de membrana celular e níveis de tióis reduzidos, respectivamente. Amastigotas foram tratadas por 24 h e incubadas com  $H_2DCFDA$  para detecção de EROs e com vermelho do Nilo para detecção de corpos lipídicos. Os ensaios foram analisados por fluorimetria, citometria de fluxo, espectrofotometria e/ou microscopia de fluorescência.

## Resultados e Discussão

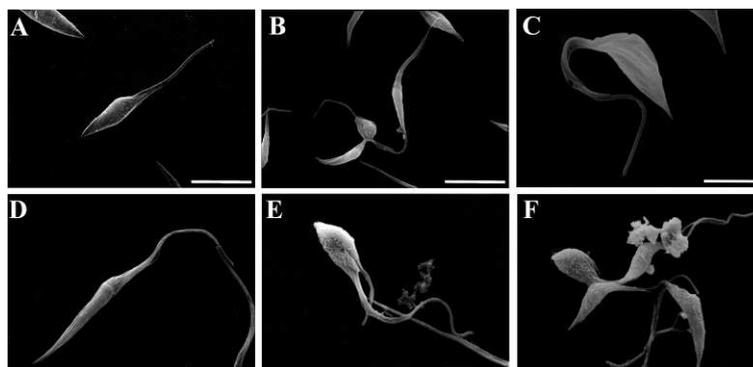
Tabela 1 mostra a atividade de **A11K3** frente a *T. cruzi*. Observa-se que o composto possui atividade contra as três formas do protozoário testadas e, pelos valores do índice de seletividade, nota-se que o composto é mais seletivo contra o protozoário do que contra células de mamíferos.

**Tabela 1.** Atividade *in vitro* da DBA **A11K3** frente ao protozoário *T. cruzi*.

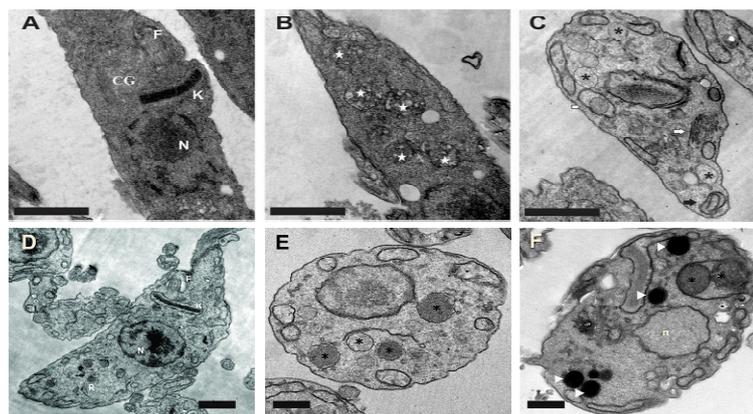
	Citotoxicidade LLC-MK2/96h $CC_{50}/96\text{ h}$	Epimastigota $IC_{50}/96\text{ h}$	IS	Tripomastigota $EC_{50}/24\text{ h}$	IS	Amastigota $IC_{50}/96\text{ h}$	IS
<b>A11K3</b>	239,35 ± 15,74	3,3 ± 0,8	72,57	24,0 ± 4,3	9,97	9,23 ± 0,8	25,93

Os resultados foram expressos em  $\mu\text{M}$ , média ± desvio padrão. O índice de seletividade (IS) foi obtido pela equação:  $IS = CC_{50}/IC_{50}$ .

A análise por MEV revelou diminuição do volume celular, encurtamento flagelar e extravasamento de conteúdo celular (Figura 1). Já por MET, foram detectadas principalmente alterações de membrana celular, acúmulo de corpos lipídicos, reservossomos e vacúolos autofágicos (Figura 2).



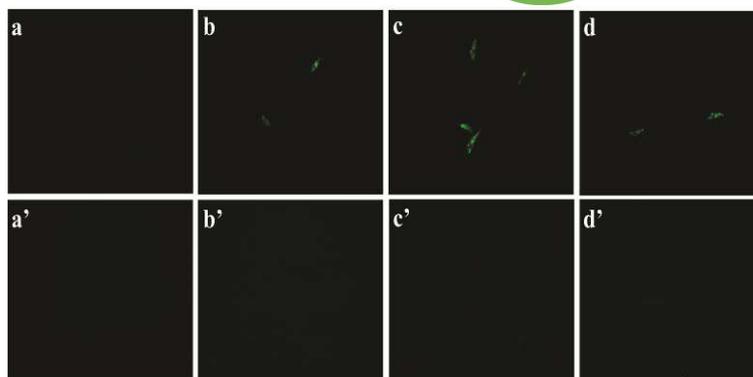
**Figura 1.** Alterações morfológicas em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A11K3** em concentrações correspondentes ao  $IC_{50}$  e  $2xIC_{50}$ . Epimastigotas não tratadas (A, D). Epimastigotas tratadas com 3,3 e 6,6  $\mu$ M por 24 h (B, C) e 96 h (E, F). Barras: 5  $\mu$ m (A, D-F), 10  $\mu$ m (B), 3  $\mu$ m (C).



**Figura 2.** Alterações ultraestruturais em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A11K3** em concentrações correspondentes ao  $IC_{50}$  e  $2xIC_{50}$ . Epimastigotas não tratadas com estruturas celulares típicas (K: Cinetoplasto; F: Flagelo; N: Núcleo; CG: Complexo de Golgi; R: Reservossomos) (A, D). Epimastigotas tratadas com 3,3 e 6,6  $\mu$ M por 24 h (B, C) e 96 h (E, F), mostrando acúmulo de corpos lipídicos (cabeças de seta), vacúolos autofágicos (\*), acúmulo de vesículas do complexo de Golgi (setas brancas), membranas concêntricas (setas pretas), alteração nuclear (n) e aumento de reservossomos (estrelas). Barras: 5  $\mu$ m (A-C), 1  $\mu$ m (D- F).

Por fluorimetria, verificou-se que o tratamento com **A11K3** levou a um aumento significativo de EROs totais em epimastigotas em comparação com o grupo controle, e uma diminuição nos níveis de EROs em amastigotas tratadas; quantidades normais de EROs são necessárias para uma função celular normal, mas níveis alterados podem desregular a homeostase redox, e concentrações excessivas levam ao estresse oxidativo. Observou-se também aumento nos níveis de tióis reduzidos, provavelmente na tentativa do sistema antioxidante combater o estresse oxidativo induzido por **A11K3**.

Em resposta ao estresse oxidativo, verificou-se o aumento de vacúolos autofágicos em epimastigotas tratadas, efeito prevenido pelo pré-tratamento com wortmanina, inibidor da PI3-quinase (enzima envolvida na regulação da autofagia) (Figura 3).



**Figura 3.** Vacúolos autofágicos em epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas com **A11K3** por 24 h em concentrações correspondentes ao  $IC_{50}$  e  $2xIC_{50}$ , utilizando marcação com MDC. (a) epimastigotas não tratadas, (a') epimastigotas não tratadas mais wortmanina, (b) controle positivo (sem soro), (b') controle positivo (sem soro) mais wortmanina, (c, d) epimastigotas tratadas com 3,3 e 6,6  $\mu$ M, respectivamente, (c', d') epimastigotas tratadas com 3,3 e 6,6  $\mu$ M mais wortmanina, respectivamente. Barras: 50  $\mu$ m.

Por citometria de fluxo, confirmou-se a perda de integridade de membrana celular de epimastigotas tratadas, que levou à ruptura da membrana, vista também por MEV. Verificou-se ainda que amastigotas tratadas com **A11K3** exibiram aumento de corpos lipídicos.

## Conclusões

A DBA **A11K3** possui atividade contra *T. cruzi*, desregulando a homeostase redox de epimastigotas e amastigotas intracelulares, causando alterações bioquímicas e morfológicas que promovem a morte celular.

## Agradecimentos

CNPq, CAPES, FINEP, COMCAP-UEM, Universidade Estadual de Maringá e Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos.

## Referências

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24, 2002.

LAZARIN-BIDÓIA, D., *et al.* Dibenzylideneacetones Are Potent Trypanocidal Compounds That Affect the *Trypanosoma cruzi* Redox System. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 890-903, 2015.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas Disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, 2018.