

AVALIAÇÃO DO EFEITO COMBINATÓRIO DO ICM-20 COM NIFURTIMOX FRENTE FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

Gustavo Vasconcelos Gomes (IC-Balcão/CNPq), Rodolfo Bento Balbinot, Danielle Lazarin-Bidóia, Tânia Ueda-Nakamura, Sueli de Oliveira Silva, Celso Vataru Nakamura (Orientador), e-mail: cvnakamura@uem.br

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

Ciências Biológicas III / Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: doença de Chagas, alternativas terapêuticas, efeito combinatório.

Resumo:

A doença de Chagas é uma doença predominantemente tropical e negligenciada, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que afeta a vida de milhares de pessoas, e apesar de ter tratamento, este, em muitos casos, se mostra ineficaz contra a fase crônica da doença e apresenta muito efeitos colaterais. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade do ICM-20 (uma combinação de ácido ascórbico e menadiona) com o fármaco nifurtimox frente as formas epimastigotas de *T. cruzi*. Para isso foram realizados testes com os compostos isolados, que apresentaram atividade contra as formas epimastigotas, e citotoxicidade mediana em células de linhagem celular LLC-MK₂. O fármaco padrão para o tratamento da doença foi utilizado como controle para os experimentos. Em seguida, foram realizados os testes de efeito combinatório destas substâncias, que apresentaram resultados favoráveis e sinérgicos na morte dos parasitos. Evidenciando assim, que a associação do ICM-20 com o nifurtimox é uma abordagem promissora no tratamento da doença de Chagas.

Introdução

A doença de Chagas é uma doença negligenciada de predominância latina e endêmica em mais de 21 países, causa milhares de mortes por ano e afeta a vida de milhões de pessoas. O agente etiológico dessa doença é o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário parasito que possui ciclo de vida complexo, sendo as suas principais formas evolutivas a epimastigota, tripomastigota e amastigota. Apesar de possuir tratamento, esse se mostra ineficaz em estágios avançados da doença (fase crônica) e apresenta alta toxicidade, que está associado com muitos efeitos colaterais (WHO, 2018).

Portanto se faz necessária a busca por novos compostos que possam combater a doença com maior eficácia e menor citotoxicidade. A busca por combinações de substâncias para o tratamento de doenças tem aumentado muito, por conta da eficiência que o sinergismo traz no combate as doenças,

esse efeito sinérgico normalmente ocorre quando duas ou mais substâncias afetam diferentes atividades importantes da células alvo, fazendo com que ela seja incapaz de sobreviver ao tratamento. Na literatura há relatos de atividade antiprotozoário do complexo de ácido ascórbico e menadiona (DESOTI, 2015). Portanto, o objetivo desse trabalho foi analisar a atividade do complexo composto por ácido ascórbico e menadiona (ICM-20) em associação com o medicamento nifurtimox frente as formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Materiais e métodos

Para avaliação da atividade antiproliferativa, formas epimastigotas de *T. cruzi* (1×10^6 parasitos mL^{-1}) na fase de crescimento exponencial foram ressuspensas em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e tratados com concentrações crescentes de ácido ascórbico (AA), menadiona (MN), nifurtimox (NFX) e benznidazol. Após 96 h de tratamento, a porcentagem de inibição foi calculada com base no controle (não tratado) por contagem dos parasitos em hemocitômetro. Os valores foram plotados e as concentrações inibitórias para 50% dos parasitos (CI_{50}) foram calculadas por regressão não linear.

Para avaliar a citotoxicidade das substâncias testadas, células LLC-MK₂ ($2,5 \times 10^5$ células mL^{-1}) foram semeadas com meio DMEM suplementado com SFB a 10% e incubadas por 24 h a 37 °C sob uma atmosfera de 5% de CO₂. As células foram então tratadas com concentrações crescentes dos compostos e incubadas durante 96 h a 37 °C com 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada por MTT (MOSSMANN, 1983). A concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi determinada por regressão não linear dos dados.

Em seguida, o efeito combinatório do ICM-20 (ácido ascórbico + menadiona) com o fármaco NFX foi avaliado. Epimastigotas (1×10^6 mL^{-1}) foram incubados com concentrações crescentes das substâncias sozinhas ou em combinação. O delineamento experimental consistiu em combinações de pelo menos seis concentrações de cada composto dispostas em *checkerboard*. A porcentagem de inibição foi calculada com base no controle (não tratado) pela contagem dos parasitos em hemocitômetro. Os valores do índice de concentração inibitória fracionada (FICI) e o índice de redução de dose (DRI) foram calculados. Além disso, os dados também foram expressos graficamente como um isoblograma, plotando as concentrações das substâncias, que sozinhas ou em combinação, diminuíram 50% do crescimento dos parasitos.

Resultados e Discussão

Os resultados obtidos mostraram que as a menadiona e o nifurtimox sozinhas já apresentaram boa atividade contra epimastigotas, e que os índices de seletividade (razão entre os CC_{50} e os CI_{50}) foram altos, como pode ser visto na Tabela 1.

Tabela 1. Atividade antiproliferativa *in vitro* do ácido ascórbico, menadiona, nifurtimox e benznidazol frente a epimastigotas de *T. cruzi* e citotoxicidade.

Substâncias	Epimastigotas CI ₅₀ ± DP (µM)	LLC-MK ₂ CC ₅₀ ± DP (µM)	IS
Ácido Ascórbico	2531,5 ± 400,4	3591,2 ± 425,1	1,4
Menadiona	2,6 ± 0,1	37,4 ± 2,8	14,4
Nifurtimox	2,6 ± 0,3	19,8 ± 3,1	7,6
Benznidazol	6,4 ± 0,4	30,8 ± 3,4	4,8

CI₅₀: concentração inibitório para 50% dos parasitos. CC₅₀: concentração citotóxica para 50% das células. IS: índice de seletividade (CC₅₀/CI₅₀).

Em seguida, foi realizado o efeito combinatório, os resultados para o ICM-20 foram expressos em termos das concentrações de AA visto que a proporção de AA e MN no complexo está sobre registro de patente. Epimastigotas tratadas por 96 h com ICM-20 apresentaram um CI₅₀ de 942,42 ± 6,76 µM, e quando em combinação com NFX o CI₅₀ foi reduzido para 609,70 ± 58,99 µM. O NFX sozinho, por outro lado, teve um CI₅₀ = 2,35 ± 0,12 µM e, quando tratado em conjunto com ICM-20, este valor foi reduzido para 0,68 ± 0,07 µM. Foi observada uma redução da dose de 5 vezes (DRI= 5,04 ± 0,54), juntamente com um FICI de 0,95 ± 0,05. Valores de FICI <1, = 1 ou > 1, representam efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos, respectivamente (CHOU, 1983), e valores de DRI > 1, indicam uma redução de dose favorável, enquanto DRI <1 indica uma redução de dose desfavorável (GAIO, 2018). Assim, a combinação ICM-20 + NFX em epimastigotas de *T. cruzi* foi considerada sinérgica. O sinergismo da combinação também foi observado no isoblograma, onde todos os pontos que atingiram 50% de inibição celular estão abaixo da linha de tendência do gráfico (**Figura 1**).

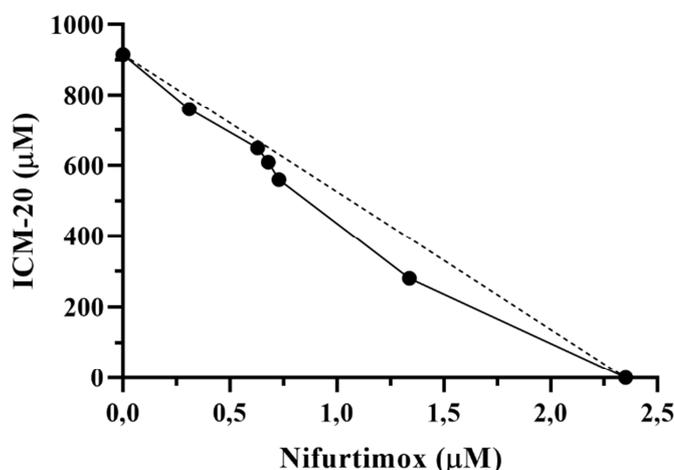


Figura 1 – Efeitos sinérgicos da combinação de ICM-20 e nifurtimox contra epimastigotas de *T. cruzi*.

Conclusões

Foi verificado que o uso da menadiona, ácido ascórbico e nifurtimox, tem ação contra o protozoário, e a associação entre eles produz um efeito do tipo sinérgico, evidenciando assim essa combinação como uma promissora alternativa terapêutica para o tratamento da doença de Chagas. No entanto, é necessário fazer estudos dessa combinação em outras formas evolutivas do *T. cruzi* (amastigotas e tripomastigotas) e avaliar os mecanismos de ação que levam a inibição do crescimento do protozoário.

Agradecimentos

Ao CNPq, a Universidade Estadual de Maringá e ao Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos.

Referências

CHOU, T. C.; TALALAY, P. Analysis of combined drug effects: a new look at a very old problem. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 4, p. 450-454, 1983.

DESOTI, V. C.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; RIBEIRO, F. M.; MARTINS, S. C.; RODRIGUES, J. H. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C.V.; XIMENES, V. F.; SILVA, S. O. The Combination of Vitamin K3 and Vitamin C Has Synergic Activity against Forms of *Trypanosoma cruzi* through a Redox Imbalance Process. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. e0144033, 2015.

GAIO, E.; CONTE, C.; ESPOSITO, D.; MIOTTO, G.; QUAGLIA, F.; MORET, F.; REDDI, E. Co-delivery of Docetaxel and Disulfonate Tetraphenyl Chlorin in One Nanoparticle Produces Strong Synergism between Chemo- and Photodynamic Therapy in Drug-Sensitive and Resistant Cancer Cells. **Molecular Pharmaceutics**, v.15, n. 10, p. 4599–4611, 2018.

MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, 65, 55-63, 1983.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)** 2018. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease>> (american-trypanosomiasis). Acesso em: 10 agosto. 2020.