

## AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA *IN VITRO* DO 3,5-DINITRO-*N*-(4-NITROBENZILIDENO)BENZO-HIDRAZIDA FRENTE A FORMAS EPIMASTIGOTAS DE *Trypanosoma cruzi*

Gustavo Vasconcelos Gomes<sup>1</sup> (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Fábio Vandresen<sup>2</sup>, Danielle Lazarin-Bidóia<sup>1</sup>, Rodolfo Bento Balbinot<sup>1</sup> (Coorientador), Celso Vataru Nakamura (Orientador), e-mail: cvnakamura@uem.br

<sup>1</sup>Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde / Maringá, PR.

<sup>2</sup>Universidade Tecnológica Federal do Paraná / Campus Londrina/ Londrina, PR.

### Ciências Biológicas III / Microbiologia Aplicada

**Palavras-chave:** doença de Chagas, alternativas terapêuticas, benzoil-hidrazonas.

#### Resumo:

A doença de Chagas é uma doença que afeta a vida de milhões de pessoas no mundo e tem por agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*. O tratamento atualmente disponível se mostra ineficiente na fase crônica da doença e apresenta diversos efeitos colaterais. Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a capacidade anti-*Trypanosoma* da substância 3,5-dinitro-*N*-(4-nitrobenzilideno) benzo-hidrazida frente a formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os experimentos antiproliferativos em epimastigotas demonstraram atividade contra o protozoário apresentando uma concentração inibitória de 50% dos parasitos (CI<sub>50</sub>) de 58,3 µM, enquanto a citotoxicidade se mostrou baixa com a concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) foi de 656,5 µM resultando em um índice de seletividade de 11,2. Na tentativa de elucidar os mecanismos de ação, pôde-se notar uma diminuição significativa da integridade de membrana e do volume celular, ao passo que é evidenciado uma maior produção de óxido nítrico se comparados com os parasitos controle. Isso pode indicar o promissor uso de benzoil-hidrazonas no combate da doença de Chagas.

#### Introdução

A doença de Chagas, uma das doenças tropicais negligenciadas, ocorre de forma endêmica em diversos países, afetando milhões de pessoas ao redor do mundo e causando milhares de mortes todos os anos. O agente etiológico dessa patologia é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, que apresenta um ciclo de vida complexo, com as formas evolutivas epimastigota, tripomastigota e amastigota. Atualmente, o tratamento para a doença de Chagas apresenta diversas limitações, como o alto custo associado à produção do medicamento (benznidazol e nifurtimox), alta citotoxicidade, e ineficácia na fase crônica da doença, momento em que a maioria das pessoas descobrem que possuem a enfermidade (WHO, 2021). Tendo em vista que o tratamento atual é ineficiente e apresenta diversos problemas, se faz necessário a busca por alternativas terapêuticas para a doença de Chagas. Diante desse cenário moléculas contendo o núcleo benzoil-hidrazonas têm se mostrado promissoras, já sendo relatada a atividade dessas substâncias contra

micobactérias (SAMPIRON *et al*, 2019). Portanto, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antiproliferativa da substância 3,5-dinitro-*N*-(4-nitrobenzilideno)benzo-hidrazida (DI5) contra epimastigotas de *T. cruzi* e os possíveis mecanismos de ação.

## Materiais e métodos

A atividade antiproliferativa foi realizada utilizando epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Y), na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos.mL<sup>-1</sup>, suplementados com 10% de soro bovino fetal em meio LIT, tratadas com concentrações crescentes de DI5 e benznidazol (BNZ). Após 96 h de tratamento, foi adicionado o reagente XTT e após 4 h de incubação, foi feita a leitura em leitor de microplacas (450 nm). A concentração inibitória para 50% dos parasitos (CI<sub>50</sub>) foi calculada utilizando o controle (não tratado) como crescimento absoluto dos protozoários.

A citotoxicidade da substância foi avaliada utilizando a linhagem celular LLC-MK<sub>2</sub> ( $2,5 \times 10^5$  células.mL<sup>-1</sup>), as células foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 h a 37 °C. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações crescentes de DI5, após 96 h de incubação a 37 °C foi adicionado o reagente MTT, incubadas por 4 h, então, feita a leitura em leitor de microplacas (570 nm) e a concentração citotóxica para 50% das células (CC<sub>50</sub>) foi calculada utilizando regressão não linear.

A determinação de integridade de membrana foi realizada utilizando epimastigotas de *T. cruzi* (Y) na concentração de  $1 \times 10^6$  parasitos.mL<sup>-1</sup>, tratados com a CI<sub>50</sub> e  $2 \times$  CI<sub>50</sub> de DI5 (58 µM e 116 µM, respectivamente) por 24 h. Em seguida, os parasitos foram centrifugados, lavados com PBS e então marcados com iodeto de propídeo (IP) (2 µg.mL<sup>-1</sup>) em PBS. Foram adquiridos 30.000 eventos em citômetro de fluxo BD FACSCalibur (Becton-Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) e analisados com o software CellQuest. Digitonina (40 µM) foi utilizada como controle positivo.

Para determinar o volume celular foi utilizado epimastigotas tratadas com DI5 (CI<sub>50</sub>,  $2 \times$  CI<sub>50</sub>), 24 h pós-tratamento as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspensas em PBS. Foram adquiridos 30.000 eventos em citômetro de fluxo BD FACSCalibur e analisados com o software CellQuest. Actinomicina D (20 mM) foi utilizada como controle positivo.

As espécies reativas de oxigênio (ERO) totais foram avaliadas utilizando epimastigotas tratadas com DI5 (CI<sub>50</sub>,  $2 \times$  CI<sub>50</sub>). Após 24 h de tratamento as células foram centrifugadas, lavadas com PBS, e então incubadas com H<sub>2</sub>DCFDA (10 µg.mL<sup>-1</sup>) por 1 h a 25 °C. Peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (50 µM) foi utilizado como controle positivo. Em seguida, foram adquiridos 30.000 eventos em citômetro de fluxo BD FACSCalibur e analisados com o software CellQuest.

A produção de óxido nítrico foi avaliada utilizando epimastigotas tratadas com DI5 (CI<sub>50</sub>,  $2 \times$  CI<sub>50</sub>). Após 24 h de tratamento as células foram centrifugadas, lavadas com PBS, e marcadas com DAF-FM (1 µM) por 30 min a 37 °C. Em seguida as células foram lavadas com PBS e incubadas por mais 15 min. Peróxido de hidrogênio (50 µM) foi utilizado como controle positivo. A aquisição de dado e análises foram realizadas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur com software CellQuest, sendo obtidos 30.000 eventos.

O acúmulo de corpos lipídicos em epimastigotas foi avaliado após o tratamento com DI5 (CI<sub>50</sub>,  $2 \times$  CI<sub>50</sub>) por 24 h. Após o tratamento as células foram centrifugadas,

lavadas com PBS, e marcadas com vermelho do Nilo ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) por 30 min.  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $250 \mu\text{M}$ ) foi utilizado como controle positivo. Foram adquiridos e analisados 30.000 eventos em citômetro de fluxo BD FACSCalibur.

Os dados de todos os experimentos foram expressos como média e desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes. Os dados foram analisados por meio da análise de variância *one-* ou *two-way* (ANOVA), com diferenças significativas identificadas pelos testes *post hoc* de Tukey. Análises realizadas com software GraphPad Prism 8.0.1.

## Resultados e Discussão

O efeito antiproliferativo e a citotoxicidade do DI5 puderam ser evidenciados e é possível observar que a concentração inibitória de 50% dos parasitos ( $\text{CI}_{50}$ ) foi de  $58,3 \pm 10,1 \mu\text{M}$ , sendo considerada uma atividade moderada. Por outro lado, a concentração citotóxica para 50% das células ( $\text{CC}_{50}$ ) foi de  $656,5 \pm 44,9 \mu\text{M}$ , mostrando ser pouco tóxica para as células. Estes valores nos mostram um índice de seletividade de 11,2 (**Tabela 1**), ou seja, a substância é onze vezes mais específica para as epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* do que para as células LLC-MK<sub>2</sub>.

**Tabela 1.** Atividade antiproliferativa *in vitro* do DI5 e benznidazol frente a epimastigotas de *T. cruzi* e citotoxicidade.

Substâncias	Epimastigotas $\text{CI}_{50} \pm \text{DP} (\mu\text{M})$	LLC-MK <sub>2</sub> $\text{CC}_{50} \pm \text{DP} (\mu\text{M})$	IS
DI5	$58,3 \pm 10,1$	$656,5 \pm 44,9$	11,2
BNZ	$21,1 \pm 2,1$	$30,8 \pm 3,4$	1,4

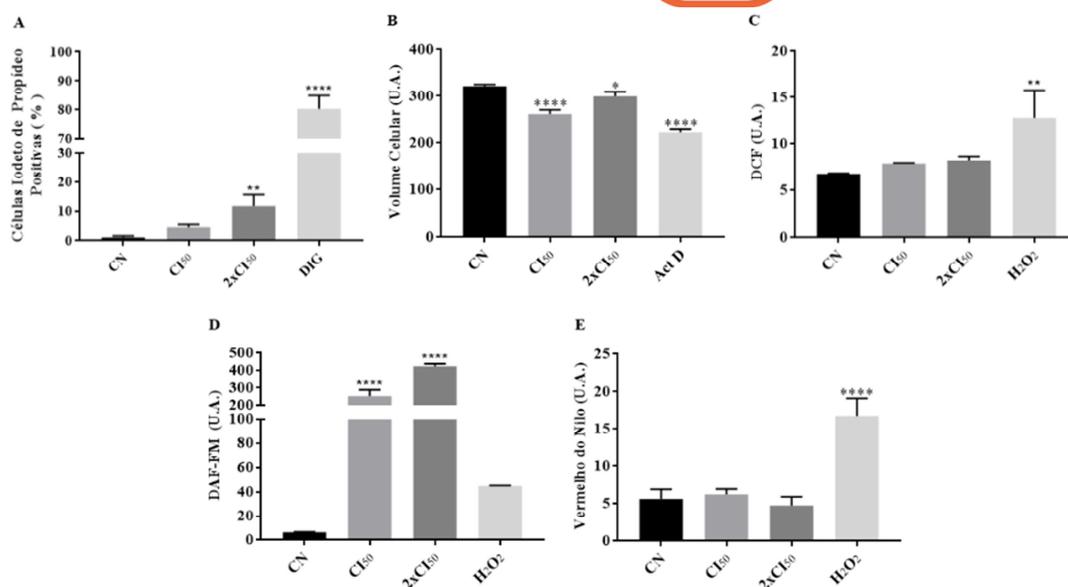
$\text{CI}_{50}$ : concentração inibitória para 50% dos parasitos.  $\text{CC}_{50}$ : concentração citotóxica para 50% das células. IS: índice de seletividade ( $\text{CC}_{50}/\text{CI}_{50}$ ).

Com base nos bons resultados obtidos na atividade antiproliferativa da substância DI5, os possíveis mecanismos de ação dessa substância foram avaliados. Os dados obtidos nos experimentos de integridade de membrana nos permitem assumir que a maior concentração testada foi capaz de diminuir significativamente a integridade da membrana celular, levando a um aumento de aproximadamente 10 vezes em relação ao controle (Figura 1 – A).

Também foi possível observar um aumento de aproximadamente 39 vezes na produção de óxidos nítricos nas células tratadas com  $\text{CI}_{50}$ , enquanto as células tratadas com  $2 \times \text{CI}_{50}$  apresentaram um perfil ainda maior chegando a aumentar em 64 vezes a produção (Figura 1 – D).

É possível observar que nenhum dos tratamentos com DI5 foram capazes de alterar significativamente os níveis de espécies reativas de oxigênio, nem de acúmulos lipídicos (Figura – B e C). Estes resultados sugerem que, provavelmente, um desbalanço oxidativo causado por ERO seja o agente desencadeador da morte celular destes parasitos.

Os efeitos observados nas epimastigotas tratadas com DI5 são condizentes com os principais mecanismos de morte de protozoários como eventos tipo apoptóticos e/ou autofágicos, porém estudos complementares são necessários para um entendimento mais aprofundado de real mecanismo.



**Figura 1** – Avaliação do tratamento de epimastigotas de *T. cruzi* com DI5 por 24 h. **A)** Integridade de membrana celular. **B)** Volume celular. **C)** Produção de espécies reativas de oxigênio. **D)** Produção de óxido nítrico. **E)** Acúmulos de corpos lipídicos. Diferenças significativas foram expressas como: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,0005$  e \*\*\*\* $p < 0,0001$ , quando comparados com o controle (CN).

## Conclusões

Com este trabalho pudemos concluir que a substância DI5 apresenta uma boa atividade contra *Trypanosoma cruzi*, e atua elevando os níveis de óxido nítrico e desestabilizando a membrana celular no parasito ao mesmo tempo que diminui o volume celular. No entanto experimentos adicionais se fazem necessários para determinar o real mecanismo de ação da substância sobre as formas epimastigotas.

## Agradecimentos

Ao CNPq, a Fundação Araucária e a Universidade Estadual de Maringá.

## Referências

SAMPIRON, E. G.; COSTACURTA, G. F.; BALDIN, V. P.; ALMEIDA, A. L.; IEQUE, A. L.; SANTOS, N. C. S.; ALVES-OLHER, V. G.; VANDRESEN, F.; GIMENES, A. C. R.; SIQUEIRA, V. L. D.; CALEFFI-FERRACIOLI, K. R.; CARDOSO, R. F.; SCODRO, R. B. L. Hydrazone, benzohydrazones and isoniazid-acylhydrazones as potential antituberculosis agents. **Future Microbiology**, London, v. 14, n. 11, p. 981–994, ago. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)** 2021. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-american-trypanosomiasis>>. Acesso em: 22 de agosto de 2021.