

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DE DICALCOGENETOS DIARÍLICOS CONTRA O *Trypanosoma cruzi*

Emanuelle Aguiar Camargo (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Celso Vataru Nakamura (Orientador), Francielle Pelegrin Garcia (Co-orientadora).
E-mail:cvnakamura@uem.br

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas, Maringá, PR.

Farmácia /Análise e controle de medicamentos

Palavras-chave: anti-*Trypanosoma cruzi*; orgânoselênio; orgânotelúrio.

RESUMO

A doença de Chagas é um grave problema de saúde pública causado pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* e afeta cerca de 10 milhões de pessoas em todo o mundo. Desde a descoberta do protozoário em humanos em 1909, não houve grandes avanços no tratamento ou controle da enfermidade. Os medicamentos usados atualmente, benznidazol e nifurtimox, são limitados e apresentam severos efeitos colaterais, além da eficácia restrita em pacientes crônicos. Assim, vê-se a necessidade de estudar novas substâncias para o controle e tratamento dessa doença. Nesse contexto, estudos com substâncias do grupo dos calcogênios têm se mostrado promissores pelas atividades biológicas já encontradas, em especial, compostos contendo telúrio ou selênio. Deste modo, o presente trabalho propõe a realização de um screening com dicalcogenetos diarílicos sobre as formas evolutivas do *T. cruzi*, sendo esta uma etapa de fundamental importância na busca de uma nova substância com maior eficácia no tratamento da doença de Chagas.

INTRODUÇÃO

Trypanosoma cruzi é um protozoário hemoflagelado e causa doença de Chagas quando seu ciclo de vida ocorre em vertebrados. A principal maneira que o parasito acessa o sistema circulatório do animal é por meio das fezes de algumas espécies de triatomíneos, popularmente conhecidos como “barbeiro”, que se infectam ao ingerir sangue contendo os parasitos, e assim, o carregam em seu intestino (COURA, 2018). Esta parasitose faz parte de um grupo de doenças chamadas de negligenciadas e tem grande predominância na América Latina. Estima-se que existam entre 6 e 7 milhões de pessoas no mundo com essa enfermidade, apresentando em média 30.000 novos casos anuais, levando à morte de 12.000 pessoas todos os anos ao redor do mundo (PAHO, 2021).

Apesar da gravidade da patologia, os meios de controle e tratamento ainda são escassos, limitando-se aos fármacos benznidazol e nifurtimox, que não são suficientes para a forma crônica da doença e ainda, possuem toxicidade, portanto,

identificar e avaliar novos compostos que apresentem atividade sobre o protozoário faz-se necessário.

O telúrio (Te) e o selênio (Se) são ametais calcogênicos, ou seja, pertencem ao grupo 16 na tabela periódica, e apresentam propriedades físicas e químicas comuns. Hoje, vê-se um crescente número de pesquisas sobre organocalcogênicos nos sistemas biológicos, e concluiu-se que há atividade biológica. Os pesquisadores identificaram propriedades inibidoras de enzimas participantes da síntese de colesterol, comprometendo os sistemas dependentes de tiol (CUNHA, 2009). Esta evidência abre espaço para aplicação de compostos contendo Te e Se contra o *T. cruzi*. Este microrganismo é dependente de colesterol, que constitui grande parte da sua membrana celular, e pode-se inferir que quando exposto às substâncias deste grupo, se a síntese do colesterol realmente for bloqueada, ocorrerá o enfraquecimento do parasito (OPPERDOES, 1987). Portanto, o objetivo do trabalho é avaliar o potencial antiparasitário de dicalcogenetos diarílicos sobre o *T. cruzi*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Substâncias

As substâncias utilizadas pertencem à classe dos dicalcogenetos diarílicos (compostos contendo telúrio ou selênio) e foram sintetizadas pela equipe do Prof. Dr. Leandro Piovan, do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR) e foram cedidas para o Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos da UEM.

Cultivo de células

Células LLC-MK₂ (célula epitelial do rim de macaco [*Macaca mulatta*]) foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com L-glutamina e 10% de soro fetal bovino. Formas epimastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram cultivadas em meio LIT (Infusão de Fígado e extrato de levedura, hemina e ácido fólico) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado.

Avaliação da atividade antiproliferativa sobre formas epimastigotas de T. cruzi

A concentração inibitória de 50% (CI₅₀) dos parasitos foi determinada a partir da contagem em câmara de Neubauer dos protozoários incubados em concentrações crescentes dos compostos e protozoários sem compostos (controle negativo).

Avaliação da citotoxicidade em células LLC-MK₂

A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi calculada utilizando regressão não linear a partir das absorbâncias obtidas após leitura em espectrofotômetro de um ensaio de XTT de células tratadas com concentrações

crescentes dos compostos que apresentaram atividade antiproliferativa e células não tratadas (controle negativo).

Avaliação das alterações morfológicas

Amostras de epimastigotas de *T. cruzi* tratadas com o composto mais ativo nas concentrações do seu CI_{50} e $2X CI_{50}$ foram visualizadas em microscópio eletrônico de varredura a fim de avaliar as alterações morfológicas. Epimastigotas tratadas com benzonidazol foram utilizadas como controle positivo e não tratadas, como controle negativo.

Deteção de espécies reativas de oxigênio (ERO) totais

A deteção de EROs totais foi realizada utilizando o marcador H_2DCFDA após o tratamento de epimastigotas com o composto mais ativo nas concentrações do seu CI_{50} e $2X CI_{50}$ e a leitura realizada em espectrofluorímetro. H_2O_2 foi utilizado como controle positivo.

Deteção do potencial da membrana mitocondrial

O potencial foi determinado após análise em citômetro de fluxo de epimastigotas tratadas com o composto mais ativo nas concentrações do seu CI_{50} e $2X CI_{50}$ e incubadas com solução de Rodamina. CCCP foi utilizado como controle positivo.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando GraphPad Prism software v. 5.00.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A atividade antiproliferativa de 10 substâncias foi avaliada: TZ3A, TZ4B, TZ5B, TZ4D, TZ5D, BT1, BB1, MC03, MC06 E TP1. Destas, 5 apresentaram atividade contra as epimastigotas de *T. cruzi* e estão descritas na Tabela 1, enquanto as outras 5 (BT1, BB1, MC03, MC06 E TP1) apresentaram a concentração inibitória de 50% dos parasitos (CI_{50}) maior que $100 \mu M$ e por isso, não tiveram seus testes continuados.

A concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) dos compostos TZ3A, TZ4B, TZ5B, TZ4D e TZ5D foi determinada, e adicionalmente foi calculado o índice de seletividade (IS) das substâncias, pela razão entre o CC_{50} e o CI_{50} . As substâncias TZ3A, TZ4B, TZ4D e TZ5D apresentaram um IS menor que 1, indicando maior toxicidade à célula do que ao protozoário. A substância TZ5B obteve destaque, pois apresentou $CI_{50} = 4,03 \mu M$, $CC_{50} = 9,9 \mu M$ e $IS = 2,46$. Portanto, ela foi selecionada para os próximos testes por ser o composto mais ativo.

Tabela 1. Avaliação do efeito tripanocida e citotóxico dos dicalcogenetos diarílicos

	TZ3A	TZ4B	TZ5B	TZ4D	TZ5D
CI₅₀ (µM)	0,6 ± 0,14	16 ± 4,09	4,03 ± 0,42	20,4 ± 2,69	13,6 ± 1,04
CC₅₀ (µM)	0,5 ± 0,1	12,3 ± 1,6	9,9 ± 0,85	18,3 ± 7	11,9 ± 2,3
IS	0,83	0,77	2,46	0,9	0,88

CI₅₀ (concentração inibitória de 50% dos parasitos). CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das células). IS (Índice de seletividade). Os resultados foram descritos como média ± desvio padrão e representam a média de três experimentos distintos.

O protozoário tratado com TZ5B nas concentrações de 4,03 µM e 8,06 µM, quando observado em microscópio eletrônico de varredura, apresentou alterações na morfologia, como enrugamento celular e perda do flagelo. Quando avaliada a produção de espécies reativas de oxigênio, houve um aumento significativo na produção, após exposição ao TZ5B na concentração de 4,03 µM. Assim como, o tratamento com o composto levou à despolarização da membrana mitocondrial, na mesma concentração.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram o potencial do TZ5B contra a forma epimastigota de *T. cruzi*, uma vez que houve alteração na morfologia celular, aumento na produção de ERO e perda no potencial da membrana mitocondrial, o que pode ter induzido à morte celular do parasito. Assim, o efeito tripanocida do TZ5B o torna um potencial candidato para novos estudos contra as outras formas evolutivas do protozoário.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa e auxílio financeiro.

REFERÊNCIAS

COURA, J. K, **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

CUNHA, R. L. O. R; GOUVEA, I. E.; JULIANO, L. A glimpse on biological activities of tellurium compounds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 2009, v. 81, n. 3.

OPPERDOES F. R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. **Annu Rev Microbiol**. 1987;41:127–151.

PAHO. **Chagas Disease**. Disponível em: <<https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease>>. Acesso em: 10 ago. 2023.