AVALIAÇÃO DO EFEITO TRIPANOCIDA *IN VITRO* DE DIAMINAS TERPÊNICAS

Kevin William Richter (BIC/Fundação Araucária/UEPG), Iriane Eger (Orientadora), e-mail: iriane.eger@gmail.com

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi* 1, atividade tripanocida 2, diaminas 3.

Resumo: A doença de Chagas é uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. Para o tratamento há apenas duas opções medicamentosas: o benzonidazol e o nifurtimox. Ambos os fármacos são pouco eficazes na fase crônica. Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito tripanocida *in vitro* de sete novos derivados de diaminas terpênicas. Formas epimastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi* foram incubadas com diferentes concentrações de diaminas terpênicas por 48 horas. A citotoxicidade sobre células de mamífero foi avaliada frente às células Vero. Com exceção de DBR12, nenhuma das diaminas foi citotóxica ou ativa contra *T. cruzi*. Os valores de CI_{50} (concentração inibitória de 50%) de DBR12 foi de 58 µM e 9,9 µM para formas epimastigotas e amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, respectivamente. A CC_{50} (concentração citotóxica de 50%) frente a células Vero foi de 44 µM e, portanto, DBR12 foi cerca 4,5 vezes mais tóxica para os amastigotas de *T. cruzi* do que para a célula hospedeira. A DBR12 pode servir de protótipo para a síntese de novas diaminas terpênicas mais potentes e específicas contra *T. cruzi*.

Introdução

A doença de Chagas é uma infecção parasitária, sistêmica e crônica causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi.* Para o tratamento há apenas duas opções medicamentosas: o benzonidazol e o nifurtimox, ativos na fase aguda da doença, curando cerca de 70% dos infectados. Entretanto, ambos os fármacos têm falhado no controle da doença, pois são pouco eficazes na fase crônica, requerem longos períodos de tratamento, podem causar efeitos colaterais severos e já existem relatos de cepas naturalmente resistentes.[1,2] Diante disto, a OMS vem incentivando estudos que possam apontar novas alternativas para o tratamento desta e outras zoonoses.

As diaminas podem ser definidas como aminas com duas ou três cadeias alifáticas conectadas por átomos de nitrogênio e agem na via de biossíntese das poliaminas de diversos parasitos, interferindo em funções essenciais, tais como biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas, proliferação e diferenciação celular.[3]

Estudos prévios de bioatividade de diaminas mostraram uma promissora atividade antiparasitária *in vitro* contra *T. cruzi* [4,5] e *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*, causadores da leishmaniose tegumentar e visceral, respectivamente.[6] O presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito tripanocida *in vitro* de sete novos derivados de diaminas terpênicas.

Materiais e Métodos

Compostos
Sete diaminas terpênicas (TG01, TG02, DBR05, DBR08, DBR10, DBR12 e DBR14), fornecidas pelo Depto. de Química da Universidade Federal de Itajubá (MG), foram solubilizadas em DMSO a 50mM e estocadas a -4ºC até os uso.

Ensaios de citotoxicidade contra células Vero
Células Vero (ATCC CCL-81) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas a 37ºC com diferentes concentrações (20 a 100 µM) dos compostos diluídos em DMEM por 48 horas. A integridade do tapete celular foi observada em microscópio invertido, seguida do ensaio colorimétrico do MTT.[7]

Triagem de compostos com atividade tripanocida
Formas epimastigotas ($5x10^6$ parasitos/ml) de *T. cruzi* foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações (5 a 100µM) das diaminas. A atividade antiparasitária foi avaliada através da técnica do MTT.[7]

Atividade tripanocida contra amastigotas intracelulares
Células Vero previamente semeadas em placas de 96 poços foram infectadas com tripomastigotas provenientes de cultivo celular. Após 24 horas, as monocamadas infectadas foram incubadas com diferentes concentrações (5, 10, 15 e 20 µM) da diamina DBR12, selecionada na triagem. Após 48 horas, as placas foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas pelo Giemsa. A avaliação da atividade tripanocida foi realizada pela contagem aleatória de 500 células por poço em microscópio invertido, observando-se o número de células infectadas e o número de amastigotas/célula.

Análise dos dados
Os valores de CI_{50} e CC_{50} (concentração inibitória/citotóxica de 50%) foram estimados a partir de três réplicas em duplicata, utilizando o programa GraphPrism Instat3®. O índice de seletividade (IS) foi calculado através da razão entre os valores de CI_{50} e CC_{50}.

Resultados e Discussão

Ensaios de citotoxicidade contra células Vero
Entre as sete diaminas avaliadas, com exceção da DBR12, nenhuma delas apresentou efeito citotóxico até a concentração mais alta utilizada nos ensaios. A diamina DBR12 apresentou valor de CC_{50} de 44 µM (Tabela 1).

Triagem de compostos com atividade tripanocida
A triagem inicial com duas concentrações das diaminas mostrou que somente a DBR12 foi ativa, sendo que a 100 µM houve uma inibição de 75% da proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi* (Tabela 2).

Tabela 1. Avaliação do efeito citotóxico de diaminas terpênicas frente às células Vero

Diaminas	CC_{50} (µM) - Vero
TG01	>100
TG02	>100
DBR05	>100
DBR08	>100
DBR10	>100
DBR12	44,04 ± 0,75
DBR14	>100

Tabela 2. Triagem inicial de diaminas ativas contra formas epimastigotas de *T. cruzi*

Diaminas	% de inibição epimastigotas	
	100 µM	10µM
TG01	NA	NA
TG02	NA	NA
DBR05	NA	NA
DBR08	NA	NA
DBR10	NA	NA
DBR12	75	NA
DBR14	NA	NA

NA= não ativo

Curva de concentração-resposta contra formas epimastigotas e amastigotas intracelulares de T. cruzi

A diamina DBR12 apresentou um percentual inibitórios do crescimento de epimastigotas variando de 18 a 70% entre as concentrações de 15 a 100 µM, sendo o valor de CI_{50} estimado em 58 µM (Figura 1A). Esse valor de CI_{50} foi semelhante a concentração citotóxica (Tabela 1), resultando em baixo índice de seletividade (IS = 0,75).

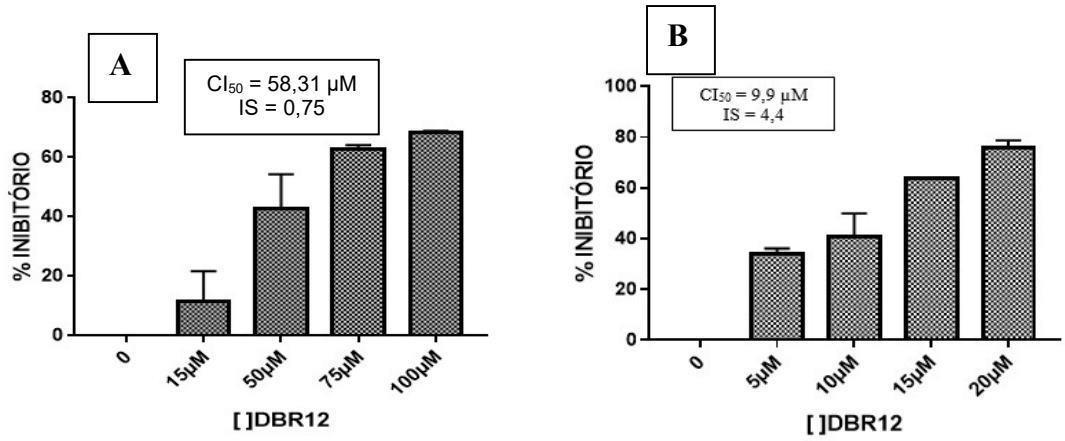


Figura 1. Curva concentração resposta de DBR12 contra formas epimastigotas (A) e amastigotas intracelulares (B) de *T. cruzi*.

Por outro lado, DBR12 foi mais potente contra forma amastigotas intracelulares do que epimastigotas, resultando em um valor de CI_{50} de 9,9 µM. Além disso, a diamina DBR12 foi cerca de 4,5 vezes mais tóxica aos amastigotas de *T. cruzi* do que às células Vero (IS = 4,4) (Figura 1B).

Conclusões

Entre as sete diaminas terpênicas avaliadas, apenas a DBR12 apresentou atividade tripanocida *in vitro* com o valor da CI_{50} de 58 µM e 9,9 µM para epimastigotas e amastigotas intracelulares, respectivamente. A DBR12 foi cerca de 4,5 vezes mais tóxica para amastigotas intracelulares do que para a célula de mamífero da linhagem Vero (IS= 4,4). Assim DBR12 pode servir como protótipo para novas mudanças químicas de diaminas terpênicas com maior eficácia contra tripanosomatídeos.

Agradecimentos

À Fundação Araucária/SETI e à UEPG pela concessão da bolsa do Programa BIC e ao suporte financeiro do CNPq (Edital MCTI/CNPq Nº 14/2014).

Referências

1 MURTA S.M.F. et al. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to benznidazole and nifurtimox. Molecular and Biochemical Parasitology, 93: 203-214, 1998.

2 PÉREZ-MOLINA J.A., MOLINA I. Chagas disease. Lancet, 17: 1-13, 2017.

3 ALGRANATI I.D. et al. Biología molecular del metabolismo de poliaminas en parásitos tripanosomátidos. Expresión de genes heterólogos de ornitina y arginina decarboxilasa en Trypanosoma cruzi. Revista Química Viva, 2: 78-94, 2006.

4 DAFFARA C.M. et al. Trypanocidal and leishmanicidal *in vitro* activity of diamine derivatives. Anais XXX Annual Meeting of the Society of Protozoology and XLI Annual Meeting on Basic Research on Chagas disease, p.198, Caxambu (MG), 2014.

5 VEIGA-SANTOS P. et al. SQ109, a New Drug Lead for Chagas Disease. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(4): 1950-1961, 2015.

6 YAMANAKA C.N. et al. Assessment of Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Aliphatic Diamine Derivatives. Chem Biol Drug Des, p.1-8, 2013.

7 SIEUWERTS A.M. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: How to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell culture *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC_{50}- values and cell survival. European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 33: 813-823, 1995.