

BUSCANDO NOVOS ALVOS PARA A TERAPIA ANTI-CHAGÁSICA: EFEITOS DE INIBIDORES DE CISTEÍNAS PROTEASES CONTRA O *Trypanosoma cruzi*

Aline Araujo Zuma^{*1}, Ramon Borges da Silva², Simon John Garden³, Wanderley de Souza⁴

1. Pós-doutoranda do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

2. Pós-doutorando do Instituto de Química, UFRJ

3. Professor do Instituto de Química, UFRJ

4. Professor do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ

Resumo

A doença de Chagas, cujo agente causador é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, é endêmica da América Latina. Sua transmissão ocorre principalmente de forma vetorial e de forma oral. Atualmente, são cerca de 6 milhões de pessoas infectadas no continente e 14.000 mortes por ano. O *T. cruzi* manifesta-se sob diferentes formas de desenvolvimento ao longo do seu ciclo de vida e que possuem algumas características próprias, como o formato do corpo e a composição molecular. Cisteína proteases, como a cruzaina, são enzimas que atuam em processos relacionados à patogenicidade destes parasitas, visto que são importantes para a diferenciação e invasão de células hospedeiras. Desta forma, dada a importância biológica destes eventos, neste trabalho investigamos os efeitos de inibidores de cisteína proteases no *T. cruzi* de modo a descobrir um composto promissor para o tratamento da doença de Chagas e estabelecer um potencial alvo quimioterápico contra este parasita.

Palavras-chave: Doença de Chagas; quimioterapia; high throughput screening.

Apoio financeiro: CNPq e FAPERJ.

Introdução

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário patogênico ao homem, sendo o agente etiológico da doença de Chagas. Ao longo do seu ciclo de vida, este protozoário infecta um hospedeiro invertebrado (triatomíneo, comumente conhecido como barbeiro) e outro vertebrado (homem e outros mamíferos, como tatus, gambás, tamanduás e quatis). O barbeiro é o responsável pela transmissão vetorial, que ocorre durante o repasto sanguíneo quando as fezes contendo as formas tripomastigotas são liberadas e estas invadem a pele e a mucosa. Outra forma de transmissão bastante comum recentemente é a oral, através do consumo de alimentos, como o açaí, contaminados com as fezes do triatomíneo (Chatelain & Ioset, 2018).

Durante o ciclo biológico do parasita, cisteína proteases (como a cruzaina), participam de processos relacionados à patogenicidade, como invasão celular, diferenciação celular, evasão e modulação do sistema imune do hospedeiro. Além disto, a cruzaina é identificada como o principal antígeno em humanos infectados e por estas razões tem sido considerada como candidata para o desenvolvimento de uma vacina (Siqueira-Neto *et al*, 2018).

Em todo o mundo existem cerca de 70 milhões de indivíduos expostos ao risco de infecção e aproximadamente 8 milhões de pessoas infectadas. O tratamento da doença de Chagas se baseia na administração do benznidazol, que até hoje ainda é a única alternativa para os indivíduos infectados (Chatelain & Ioset, 2018). De acordo com levantamento feito pela organização internacional Médicos Sem Fronteiras, no período compreendido entre 1975 e 1999, foram aprovadas 1393 drogas no total para diversas enfermidades. Destas, apenas 16 eram voltadas para doenças negligenciadas (MSF, 2001), o que reforça a necessidade de ampliar a busca por novos quimioterápicos.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de novos derivados da 1,10-fenantrolina, cujo alvo são cisteínas proteases, no *T. cruzi* de modo a contribuir para a descoberta de um composto promissor

contra doença de Chagas e destacar estas enzimas como promissores alvos quimioterápicos contra esse parasita.

Metodologia

As formas epimastigotas foram mantidas em meio LIT enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) a 28°. Os amastigotas foram mantidos em células epiteliais LLC-MK₂ cultivadas em meio RPMI, com 5% de SFB, em estufa a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Após 24 horas, as culturas foram infectadas com tripomastigotas sanguíneos de *T. cruzi* cepa Y obtidos de culturas previamente infectadas.

Para quantificar o número de células infectadas e o de parasitas por célula foi utilizada a plataforma de *High Throughput Screening* (Triagem de Alto Desempenho). Para isto, culturas de LLC-MK₂ e as formas tripomastigotas (1:50) foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C e a 5% de CO₂. Após 24 horas, as células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos por 96 horas. Após este período, a cultura foi incubada com Hoeschst e a quantificação feita a partir da aquisição de imagens em microscópio óptico de fluorescência automatizado ImageXpress Micro (Molecular Devices) para posterior análise através do software específico MetaXpress® High-Content Image Acquisition and Analysis, no Centro Nacional de Biologia Estrutural e Bioimagem (Cenabio II) na UFRJ.

Para avaliar a atividade dos compostos sobre as formas tripomastigotas, estes foram coletados a partir do sobrenadante das células previamente infectadas e tratados com diferentes concentrações dos inibidores por 24 horas a 37 °C. Após este período, os parasitas foram quantificados em câmara de Neubauer.

Para a investigação de possíveis alvos intracelulares, os epimastigotas tratados por até 72 horas foram preparados para a técnica de microscopia eletrônica de transmissão. Para isto, os parasitas foram fixados em glutaraldeído 2,5% e pós-fixados em solução de ferrocianeto de potássio 1,25% e ósmio 1% por 1 hora. Em seguida, as células foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e infiltradas em resina Epon. Os cortes ultrafinos foram obtidos através de ultramicrotomia e contrastados em acetato de uranila e em citrato de chumbo. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss 900, Jeol 1200 ou Tecnai Spirit (Cenabio III).

Para a análise morfológica do *T. cruzi* por microscopia eletrônica de varredura, os epimastigotas tratados por até 72 horas foram fixados como descrito acima, aderidos a lamínulas previamente revestidas com Poli-L-lisina, pós-fixados e desidratados como explicado anteriormente. Em seguida, as amostras foram levadas para o equipamento de secagem em presença de CO₂ líquido (ponto crítico) e metalizadas com ouro para a observação em microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 200 (Cenabio III).

Resultados e Discussão

Inicialmente, os compostos tiveram seu potencial anti-proliferativo testado em epimastigotas de *T. cruzi* e a toxicidade avaliada em culturas de LLC-MK₂. Dentre estes, há alguns com significativa capacidade anti-proliferativa, ao mesmo tempo que, apresentaram baixa toxicidade para células de mamíferos, culminando em boa seletividade contra o parasita em questão. Os compostos Fen 2, Fen 12 e Fen 13 se mostram promissoras visto a grande diferença entre os valores de IC₅₀ e CC₅₀ obtidos no *T. cruzi* (0.5 µM, 4.5 µM e 6.5 µM) e em LLC-MK₂ (20 µM e 50 µM), respectivamente.

A respeito do efeito nas formas tripomastigotas, destaca-se a atividade de Fen 2, Fen 12 e Fen 13, que se mostraram os inibidores mais seletivos contra os parasitas (LD₅₀ igual a 4 µM, 1 µM e 10 µM). Para os ensaios de High Throughput Screening foram selecionados os inibidores que apresentaram os menores valores de CC₅₀, ou seja, que foram menos tóxicos para as células de mamífero. Fen 2 causou o maior efeito tripanocida, visto o baixo valor de IC₅₀. Com Fen 13 houve boa inibição da proliferação dos amastigotas com doses maiores, assim

como visto com Fen 12 (IC₅₀ igual a 0.5 µM, 3 µM e 0.5 µM).

Em relação às alterações ultraestruturais, Fen 1 levou ao aparecimento de perfis de membrana no interior do núcleo e ao afundamento do corpo celular. O composto Fen 2 promoveu a intensa da vacuolização do citoplasma, sugerindo a ocorrência de autofagia, o que poderia inclusive explicar a drástica redução da proliferação celular. Após o tratamento com o composto Fen 5, notou-se a proximidade do retículo endoplasmático com a membrana plasmática e o arredondamento de alguns parasitas. O composto Fen 6 causou a vacuolização dos parasitas, levou à maior compactação da heterocromatina, aspecto este que é um indício de apoptose, e intensa alteração da morfologia, que caracterizou-se pelo arredondamento e achatamento do corpo celular. O composto Fen 12 causou a descompactação da cromatina nuclear que pode indicar quebras no DNA e bloqueio de ciclo celular, ambos importantes e capazes de interferir na proliferação do parasita. Houve ainda o afilamento da região posterior do corpo celular. Na presença do composto Fen 13, foram observadas estruturas eletrondensas próximo ao kDNA e novamente a alteração na morfologia do parasita, como descrito acima.

Na presença do composto Fen 16, um dos mais tóxicos deste grupo, não houve a formação de atípicas projeções da membrana plasmática. Fen 17, apesar da sua toxicidade, não causou alterações ultraestruturais em organelas dos parasitas, contudo estes encontravam-se enrugados e com formato menos alongado. Por fim, Fen1-10 levou a diferenças na topologia do kDNA, que perdeu o aspecto típico de bastão condensado.

Conclusões

Neste trabalho foram avaliados 10 novos derivados da 1,10-fenantrolina contra as diferentes formas de desenvolvimento do *T. cruzi*. A fim de verificar o potencial tripanocida, as formas tripomastigota e amastigota foram tratadas com diferentes concentrações destes inibidores. E com o objetivo de averiguar alterações ultraestruturais e apontar possíveis alvos celulares, foi feito o tratamento das formas epimastigotas.

Destes 10 compostos, 3 se mostraram promissores contra o *T. cruzi*, visto que apresentaram baixos valores de IC₅₀ contra os amastigotas, de LD₅₀ contra os tripomastigotas e foram pouco tóxicos para as células hospedeiras.

Analisando os resultados obtidos neste estudo, podemos reforçar que as cisteínas proteases podem ser exploradas como alvos quimioterápicos contra o *T. cruzi*, podemos contribuir com o conhecimento sobre o papel destas enzimas na proliferação, ultraestrutura e diferenciação deste protozoário e ainda eleger novos compostos para estudos *in vivo*.

Referências bibliográficas

CHATELAIN E, IOSET JR. **Phenotypic screening approaches for Chagas disease drug discovery.** *Expert Opin Drug Discov.* (2):141-153, 2018.

MÉDICOS SEM FRONTEIRAS. **Fatal imbalance: the crisis in research and development for drugs for neglected diseases.** Disponível em: <https://www.msf.org/fatal-imbalance-crisis-research-and-development-drugs-neglected-diseases>. Acesso em 23/02/2020.

SIQUEIRA-NETO JL, DEBNATH A, MCCALL LI, BERNATCHEZ JA, NDAO M, REED SL, ROSENTHAL PJ. **Cysteine proteases in protozoan parasites.** *PLoS Negl Trop Dis.* 12(8):e0006512, 2018.