ÁREA DE SUBMISSÃO: PESQUISA CLÍNICA E PRÉ-CLÍNICA – PCPC05

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE TRIPANOCIDA E CITOTÓXICA DE 1,3 TIAZÓIS SUBSTITUÍDOS

M. S. BARBALHO², A. C. C. SILVA¹, A. P. O. MENDES¹, M. C. H. B. DIAS³, D. M. N. MOURA¹, A. C. L. LEITE³, V. P. HERNANDES¹

¹Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, Departamento de Imunologia, 50.740-465, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil

²Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde/Fiocruz-PE

³Universidade Federal de Pernambuco *campus* Recife, Dept. de Ciências Farmacêuticas

E-mail para contato: maymaybarbalho@gmail

RESUMO – *Um dos grandes desafios no tratamento da doença é a descoberta de fármacos mais eficazes e menos tóxicos no combate a mesma. Sendo assim, o objetivo do trabalho foi investigar in vitro a ação tripanocida e citotóxica de dezessete novos compostos com conhecida ação anti-parasitária 1,3 tiazóis substituídos e tendo como alvo molecular a cruzaina. A atividade tripanocida foi avaliada frente a forma tripomastigotas de Trypanosoma cruzi. Para investigar a atividade citotóxica, macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram avaliados utilizando-se MTT. Os compostos de maior destaque relacionando a atividade tripanocida e a citotoxicidade foram DGM 1.7 e DGM 1.3, comparando-se ao benzonidazol, droga de referência. Os resultados incentivam a continuidade da avaliação com o objetivo de encontrar uma nova abordagem terapêutica para a doença de Chagas.*

Palavras-chave: *doença de Chagas, tiazóis, Trypanosoma cruzi*

SUMMARY - *One of the great challenges in treating the disease is the discovery of more effective and less toxic drugs in the fight against it. Therefore, the objective of the study was to investigate in vitro the trypanocidal and cytotoxic action of seventeen new compounds with known anti-parasitic action 1,3 substituted thiazoles and having a molecular target of cruzaine. The trypanocidal activity was evaluated against trypomastigote form of Trypanosoma cruzi. To investigate the cytotoxic activity, RAW 264.7 macrophages were evaluated using MTT. The major compounds related to trypanocidal activity and cytotoxicity were DGM 1.7 and DGM 1.3, compared to benzonidazole, the reference drug. The results encourage the continuity of the evaluation in order to find a new therapeutic approach for Chagas' disease.*

Key words: *Chagas disease, tiazolidinonics, Trypanosoma cruzi*

1. INTRODUÇÃO

O agente etiológico da doença de Chagas é o parasito *Trypanosoma cruzi*, que atinge cerca de 17 milhões de pessoas nas Américas, com 3 a 3,3 milhões de casos sintomáticos e incidência anual de 200 mil casos em 21 países, onde aproximadamente 2 milhões encontram-se no Brasil (WHO, 2015).

O controle da doença depende dos avanços no âmbito das pesquisas desenvolvidas nas áreas do diagnóstico e, sobretudo, na busca por novas alternativas terapêuticas de baixo custo, reprodutíveis e eficazes. Nenhuma droga foi aprovada nos últimos 40 anos para o tratamento da doença (BELLERA *et al.*, 2015). O tratamento utilizado atualmente é baseado em duas drogas: o benzonidazol e o Nifurtimox, porém eles são mais efetivos na fase aguda da doença em detrimento da fase crônica, além de possuírem uma alta toxicidade (MORILLA; ROMERO, 2015). Apenas o tratamento com o benzonidazol é permitido no Brasil.

As oportunidades de pesquisa na área de planejamento de fármacos são promissoras principalmente com os avanços nas áreas de biologia molecular, química medicinal e computacional. Diante disso, várias moléculas vêm sendo exploradas utilizando métodos de planejamento de fármacos baseados na estrutura do receptor (SBDD - *structure-based drug design*) e na estrutura do ligante (LBDD - *ligand-based drug design*) (DIAS *et al.*, 2009). Um dos representantes de estudo de alvos moleculares para o desenho de novos fármacos antichagásicos é a cruzaina, também chamada de cruzipaína (GP57/51 ou TCC) que constitui a mais abundante proteína da família das cisteíno-proteases de *T. cruzi*, e é a enzima-chave da replicação intracelular do parasita (CLAYTON, 2010).

Sendo assim, candidatos a novos fármacos tripanocidas, compostos 1,3 tiazóis substituídos foram investigados *in vitro* quanto à ação anti-*T. cruzi* em ensaios sobre formas tripomastigotas desse parasito. Também foi avaliada a citotoxicidade *in vitro* desses compostos sobre macrófagos da linhagem RAW264.7.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os 17 compostos testados (DGM – 5 mg/mL) foram diluídos em DMSO e acondicionados em -20°C. Para a avaliação da atividade tripanocida dos compostos, inicialmente os parasitas nas formas epimastigotas e tripomastigotas foram cultivados. As formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi* (cepa Y) foram obtidas através de camundongos *Swiss* infectados, através de punção cardíaca, no pico da parasitemia (7 dias p.i.), tais células foram mantidas em cultura de células VERO em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, Co., St. Louis, MO, USA) a 37 ° C e 5% de CO₂. Em seguida, as formas tripomastigotas (cepa Y) 4 x 10⁶ parasitas/mL mantidas em meio RPMI (suplementado com 1 antibiótico e mais 10% de SFB) à 37°C, foram incubadas por 24 horas na presença de 5% de CO₂ e semeadas em placas de 96 poços na presença dos compostos em diferentes concentrações (0,19-100 µg/ml). O controle negativo foi obtido através de poços contendo apenas meio de cultura e parasitos (sem tratamento) e a droga de referência utilizada foi o benzonidazol (Bzn). O teste foi realizado em duplicata, sendo a viabilidade do parasita determinada através de contagem direta em câmara de Neubauer e baseado nesses valores foi obtido a IC₅₀ (concentração que inibe em 50% o crescimento dos parasitas), por meio de regressão linear utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 para Windows. Para avaliar a citotoxicidade, os macrófagos da linhagem RAW264.7 foram semeados em placas de 96 poços contendo meio DMEM completo em atmosfera de 5% de CO₂ a 37 ° C por 24h. Posteriormente, foram adicionados os compostos

em diferentes concentrações (0,19-100 µg/ml), sendo novamente incubados durante 48h. Cada composto foi testado em duplicata. Após esse período, foi adicionado MTT (5 mg/mL em PBS), seguido de nova incubação por 2h. Foi acrescentado DMSO para dissolução dos cristais de formazan e a absorbância foi lida a 570 nm. O controle negativo da reação foi obtido em macrófagos sem tratamento, levando também em consideração a atividade da droga de referência (Bzn). A partir dos valores de inibição da cultura, foi obtida a CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das células) por meio também de uma regressão linear simples utilizando o “software” Prisma 5.0 Graphpad.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Três compostos se destacaram em relação a sua atividade anti-tripomastigotas, em relação ao BZN (10,66 µg/ml), que foram DGM 1.7 (1,25 µg/ml), DGM 1.3 (1,41 µg/ml) e DGM 1.10 (1,90 µg/ml). Todos os compostos testados pela metodologia do MTT mostraram algum grau de atividade citotóxica, com os valores de CC₅₀ variando de 11,56 µg/ml a 43 µg/ml (Tabela 1). A maioria dos compostos demonstrou menor toxicidade em relação ao Bzn.

Tabela 1 – Atividade antiparasitária e citotóxica de compostos 1,3 tiazóis substituídos

Composto	Tripomastigota (cepa Y) IC ₅₀ (µg/ml)	Citotoxicidade (RAW 264.7) CC ₅₀ (µg/ml)
DGM1.1	4,58	11.98
DGM1.2	8,91	17.51
DGM1.3	1,41	17.10
DGM1.4	13,17	11.56
DGM1.5	ND	39.09
DGM1.6	11,85	20.91
DGM1.7	1,25	29.53
DGM1.9	29,47	43.0
DGM1.10	1,90	16.9
DGM1.11	ND	14.20
DGM1.13	ND	12.91
DGM1.14	ND	15.44
DGM2.1	ND	15.51
DGM2.3	6,98	21.87
DGM2.4	17,77	16.93
DGM2.5	1,98	40.0
DGM2.7		35.15
Miltefosina		23.10
Benzonidazol	10,66	119.5

Os compostos que tiveram resultado Não Determinado (ND) serão novamente testados. Os compostos de maior destaque relacionando a atividade tripanocida e a citotoxicidade foram DGM 1.7 e DGM 1.3.

4. CONCLUSÃO

Alguns dos compostos se destacaram relacionando a atividade tripanocida e a baixa citotoxicidade, o que nos incentiva a continuar a investigação desses compostos com o objetivo de encontrar uma nova abordagem terapêutica para a doença de Chagas.

5. REFERÊNCIAS

- BELLERA, C. L. et al. Computer-guided drug repurposing: Identification of trypanocidal activity of clofazimine, benidipine and saquinavir. *European journal of medicinal chemistry*, v. 93, p. 338-348, 2015.
- CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline. *Nature*, v. 465, n. 7301 p. S12-S15, 2010.
- DIAS, L. C. et al. Quimioterapia da doença de Chagas: estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. *Química Nova*, v. 32, n. 9, p. 2444-2457, 2009.
- MORILLA, M. J.; ROMERO, E. L. Nanomedicines against Chagas disease: an update on therapeutics, prophylaxis and diagnosis. *Nanomedicine*, v. 10, n. 3, p. 465-481, 2015.
- WHO, Chagas disease (American *trypanosomiasis*). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em 26 de setembro de 2016.

6. AGRADECIMENTOS

Ao órgão de fomento FACEPE pelo financiamento do projeto e ao Instituto Aggeu Magalhães pela infra-estrutura.