AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE CANDIDATOS A FÁRMACOS ANTICHAGÁSICOS

A. C. C. SILVA¹, S. B. da SILVA², A. P. O. MENDES³, M. C. A. B. de CASTRO⁴, D. R. M. MOREIRA⁵, A. C. L. LEITE⁶, V. R. A. PEREIRA³

¹ Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde/Fiocruz-PE

² Bolsista PIBITI/Fiocruz-PE

³ Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE

⁴ Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória

⁵ Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fiocruz-BA

⁶ Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Farmácia

E-mail para contato: catarinacristovao@outlook.com

RESUMO – *A doença de Chagas é uma doença negligenciada. Uma das medidas para seu controle é a pesquisa por novos fármacos para o tratamento da doença, que tem evoluído sensivelmente nos últimos anos. Um importante teste in vitro é a avaliação da atividade imunomoduladora de compostos candidatos a fármacos, sabendo-se que o sucesso quimioterápico está ligado a interação dos fármacos com a resposta imune do indivíduo. Nesse contexto, 6 compostos tiossemicarbazônicos inéditos foram avaliados, quantificando-se as citocinas presentes no sobrenadante de cultura de esplenócitos murinos por meio de kit CBA para citometria de fluxo. Destacaram-se quanto a indução da produção das diferentes citocinas avaliadas dos perfis Th1, Th2 e Th17, os compostos TD-01, TD-02, TD-06 e TD-09, sendo que o composto TD-06 foi capaz de induzir citocinas dos 3 perfis. Esses resultados corroboram com o desempenho apresentado em testes de citotoxicidade e atividade antichagásica anteriores, mostrando que esses compostos são promissores como novos fármacos para a doença.*

Palavras-chave – *doença de Chagas, citocinas, tiossemicarbazonas.*

ABSTRACT – *Chagas disease is a neglected tropical disease, and one way to control it is researching for new drugs to treat the illness, search that has evolved significantly. An important test in vitro is the immunomodulatory activity evaluation of new drug candidates, knowing that the chemotherapeutic success is linked to the drug interaction with the individual's immune response. Thus, 6 new thiosemicarbazones were evaluated, through quantifying of the cytokines present on the culture supernatant of murine splenocytes with an CBA kit for flow cytometry. The compounds that stood out inducing the production of the different cytokines from the T helper cells Th1, Th2 e Th17 were TD-01, TD-02, TD-06 e TD-09. The TD-06 was able to induce cytokines from the 3 types of cells. These results corroborate with performance shown in previous tests of cytotoxicity and antichagasic activity, demonstrating that these compounds can be promising as a new therapeutic approach for the disease.*

Key words – Chagas disease, cytokines, thiosemicarbazones.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (2017), o número de pessoas infectadas pela doença de Chagas é estimado em 8 milhões em todo o mundo, distribuídas principalmente na América Latina, onde a doença é endêmica. No entanto, devido a globalização e padrões de migração, hoje a doença se estende para além dessas regiões, alcançando um padrão global com presença em todos os continentes (BERMUDEZ et al., 2015). O alastramento da doença torna importante o aumento da consciência da sociedade médica e de saúde em geral a respeito de diagnóstico, cuidados clínicos e tratamentos (DUTRA et al., 2014).

Avanços expressivos causados pelo aprimoramento tecnológico ocorreram tanto na área química quanto biológica, assim como a melhor compreensão de vias bioquímicas, alvos moleculares, além dos mecanismos que levam ao aparecimento e desenvolvimento de doenças. A química medicinal utiliza estratégias de planejamento de fármacos baseadas nesse conhecimento para tornar possível a descoberta de inovações terapêuticas notáveis como a identificação de moléculas com atividade biológica de forma rápida e efetiva, proporcionando melhorias significativas na qualidade de vida das diversas populações em todo o mundo (GUIDO et al., 2010). Um dos enfoques das pesquisas em relação à doença de Chagas tem sido o desenvolvimento de medidas eficazes para seu controle (BONNEY, 2014). Uma dessas medidas é a pesquisa por novos fármacos para o tratamento da doença, que tem evoluído sensivelmente nos últimos anos (BUCKNER; NAVABI, 2010).

Vale ressaltar que o sucesso quimioterápico está ligado a interação dos fármacos com a resposta imune do indivíduo. E, embora exista um conflito sobre o mecanismo da patologia da doença de Chagas, o papel da resposta imune tem sido relatado nas fases aguda e crônica da doença (BOARI et al., 2012; HYLAND et al., 2007;). Assim, as duas fases da doença possuem aspectos imunológicos variados.

Na fase aguda, essa resposta envolve as diferentes células do sistema imunológico e a produção de citocinas do perfil Th1 (pró-inflamatórias). O perfil Th2 está relacionado a suscetibilidade à doença, onde a principal citocina envolvida é IL-4 (HIYAMA et al., 2001), e também tem a citocina IL-10 como uma reguladora da atividade pró-inflamatória. Além da dicotomia Th1/Th2, células Th17 também demonstraram ajudar no controle da infecção e da inflamação cardíaca na fase aguda em modelo experimental da doença, modulando a resposta Th1 (GUEDES et al., 2010). Com relação à fase crônica, os sinais e sintomas clínicos dos pacientes, ou a sua ausência na forma indeterminada, parecem estar relacionados com a resposta imunológica do indivíduo, em que o equilíbrio entre os perfis vai diferir dependendo da forma em que se apresenta a doença, sintomáticas ou a indeterminada (DUTRA et al., 2009; POVEDA et al., 2014). Como as células do sistema imune estão ligadas ao desenvolvimento e patogênese da doença de Chagas, torna-se fundamental o estudo e interação dos fármacos com linfócitos e as citocinas por eles produzidas.

Nessa busca por uma nova abordagem terapêutica, as tiossemicarbazonas são uma classe de compostos que vem demonstrando diversas propriedades químicas e biológicas como atividade antitumoral, antiviral, bactericida e antiparasitária, também podendo ser usadas como intermediárias para obtenção de outros compostos com atividades

farmacológicas diversas (TENÓRIO et al., 2005; ADAMS et al., 2013). Como consequência, elas despertam o interesse científico, por também terem uma síntese simples e eficaz.

Embora os mecanismos de ação dessa classe sejam variados, e acredite-se que seja pela inibição de vários alvos (GREENBAUM et al., 2004), sua atividade anti-*T. cruzi* é devido a especificidade para a enzima cruzaina (TCC), enzima chave da replicação intracelular do protozoário e que também participa em seu mecanismo de escape ao sistema imune do hospedeiro (ALVAREZ et al., 2012). A parte da estrutura das tiossemicarbazonas a que se atribui a interação 'ligante-TCC' é o carbono tiocarbonilado presente, que interage com resíduos da enzima (DU et al, 2002). Essa ação pode ser potencializada ou ainda inativada por diferentes radicais (LEITE et al, 2006).

Sendo assim, utilizou-se para esse trabalho 6 compostos tiossemicarbazônicos inéditos que previamente apresentaram melhor desempenho em testes de citotoxicidade e atividade antichagásica (SILVA et al., 2016), sendo assim bons candidatos para a análise da atividade imunomoduladora. Esses possíveis novos fármacos tripanocidas foram avaliados *in vitro* por meio da quantificação de citocinas específicas dos perfis Th1, Th2 e Th17, presentes no sobrenadante de cultura de células esplênicas, utilizando-se citometria de fluxo.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

- **Compostos e animais**

Os compostos testados foram solubilizados em DMSO e estocados a -20°C. Para os ensaios, cada composto foi diluído na concentração apropriada utilizando-se o meio de cultura adequado. Foram utilizados 5 camundongos *Mus musculus* das linhagens isogênicas BALB/c, machos, com 6 - 8 semanas de idade, pesando 20 ± 2 g e provenientes do biotério da FIOCRUZ-PE. O protocolo de experimentação animal, utilizado no presente trabalho, foi aprovado pela CEUA da FIOCRUZ -PE com registro 102/2016.

- **Obtenção de esplenócitos murinos**

Removeu-se o baço de camundongos sacrificados em câmara de CO₂. Os baços foram macerados e as suspensões celulares foram centrifugadas em meio RPMI. O sedimento foi ressuspensionado em meio suplementado com soro fetal bovino (SFB). A viabilidade celular foi verificada em câmara de Neubauer.

- **Obtenção do sobrenadante de cultura para quantificação da produção de citocinas**

As suspensões das células esplênicas foram depositadas em placas de 24 poços (10⁶ células/ml), em duplicata. As células foram tratadas com 1x e 2x a IC₅₀ (concentração que inibe o crescimento de 50% de parasitas) para tripomastigotas dos diferentes compostos conforme Tabela 1, seguindo protocolo estabelecido e as placas mantidas em estufa à 37°C, 5% de CO₂ durante 24, 48, 72 h e 6 dias (tempo padronizado mediante ensaio cinético prévio). Após o tempo de incubação, centrifugaram-se as placas (1800 x g por 10 min, a T.A.) e os sobrenadantes de cultura foram coletados e estocados a -20°C. A droga de referência foi o benzonidazol e utilizou-se como controle de estimulação a concanavalina A (ConA), e o controle sem tratamento foi denominado de basal.

Tabela 1 – Atividade tripanocida frente a tripomastigotas dos compostos tiosemicarbazônicos.

Código	Tripomastigota (cepa Y) IC ₅₀ (µg/ml)	Tripomastigota (cepa Y) 2xIC ₅₀ (µg/ml)
TD-01	7,5	15
TD-02	12,41	24,82
TD-03	2,61	5,22
TD-04	14,84	29,68
TD-06	6,61	13,22
TD-09	6,61	13,22

- Dosagem de citocinas por citometria de fluxo**

As citocinas foram mensuradas de sobrenadantes de cultura tratados ou não com os compostos. Os níveis de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ , IL-2, IL-6 e TNF), Th2 (IL-4 e IL-10), e Th17 (IL-17A) foram dosados por citometria de fluxo em relação aos 4 tempos de tratamento diferentes. Foi utilizado o kit CBA *mouse* Th1/Th2/Th17 (BD™ Cytometric Bead Array CBA, Catálogo #560485, BD Bioscience, San Jose, CA) segundo recomendações do fabricante. A aquisição dos dados foi feita através do citômetro FACSCalibur (BD Bioscience) e as análises através do software FCAP Array v3 (Soft Flow Inc).

- Análise Estatística**

A análise estatística foi realizada empregando-se testes não paramétricos. Foi feito teste de regressão linear simples para obtenção da IC 50. A análise para medir a variabilidade entre o grupo tratado foi o teste Wilcoxon e entre grupos tratado e controle foi o teste Mann-Whitney. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5%.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após realização dos testes, avaliou-se a capacidade de indução de citocinas dos compostos. Houve uma variedade de perfis induzidos por eles, tanto de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IFN- γ , quanto de regulatórias como IL-10. No entanto, a partir do tempo de 72h, observou-se que os compostos aumentaram a variedade de produção das citocinas dos diferentes perfis estudados. O tempo de 6 dias destacou-se, pois todas as citocinas apresentadas foram produzidas em maior quantidade, sendo o escolhido para exposição dos dados. A única citocina que não apresentou produção significativa para nenhum composto foi IL-4.

Quanto ao perfil Th1, em relação à produção de IFN- γ , IL-2, IL-6 e TNF, os compostos TD-01, TD-09, TD-02 e TD-06 respectivamente, foram seus melhores indutores, tendo cada um seu melhor desempenho no tempo de 6 dias e no tratamento com 2xIC₅₀. Esses resultados foram estatisticamente significativos tanto com relação ao basal, quanto com relação ao tratamento com o benzonidazol (1x e 2xIC₅₀). Vale salientar que o benzonidazol induziu diminuição significativa de IFN- γ e IL-2 em relação ao basal.

Figura 1 – Gráficos da indução da produção das citocinas IFN- γ (A), IL-2 (B), IL-6 (C) e TNF (D) pelos diferentes compostos tiossemicarbazônicos no tempo de 6 dias. Comparado com o basal, $*p<0,05$; comparado com o tratamento com o Bzn (1x e 2x a IC_{50}), $^{\circ}p<0,05$; comparado com tratamento com o Bzn 1x IC_{50} , $^ap<0,05$; comparado com tratamento com o Bzn 2x IC_{50} , $^bp<0,05$. As medianas mínima e máxima são descritas.

Para o perfil Th2, o maior indutor de IL-10 foi o composto TD-06 na concentração de 1x IC_{50} conforme Figura 2. Esses resultados foram estatisticamente significativos tanto com relação ao basal, quanto com relação ao tratamento com o benzonidazol (1x e 2x IC_{50}).

Figura 2 – Gráfico da indução da produção da citocina IL-10 pelos diferentes compostos tiossemicarbazônicos no tempo de 6 dias. Comparado com o basal, $*p<0,05$; comparado com o tratamento com o Bzn (1 e 2x a $IC_{0,05}$), $^{\circ}p<0,05$; comparado com tratamento com o Bzn 1x IC_{50} , $^ap<0,05$; comparado com tratamento com o Bzn 2x IC_{50} , $^bp<0,05$. As medianas mínima e máxima são descritas.

Com relação ao perfil Th17, o composto que mais produziu a citocina IL-17 foi TD-06 no tratamento com $2xIC_{50}$, como visto na Figura 3. Esse resultado foi estatisticamente significativo tanto com relação ao basal, quanto com relação ao tratamento com o benzonidazol ($1x$ e $2xIC_{50}$).

Figura 3 – Gráfico da indução da produção da citocina IL-17 pelos diferentes compostos tiosemicarbazônicos no tempo de 6 dias. Comparado com o basal, $*p<0,05$; comparado com o tratamento com o Bzn ($1x$ e $2x$ a IC_{50}), $^op<0,05$; comparado com tratamento com o Bzn $1xIC_{50}$, $^ap<0,05$; comparado com tratamento com o Bzn $2xIC_{50}$, $^bp<0,05$. As medianas mínima e máxima são descritas.

O perfil Th1 se mostra importante no combate à doença, sendo fundamental que um fármaco antichagásico possa induzir essa resposta, como foi o caso de vários dos compostos testados. Mas deve ser considerado também o papel dos perfis reguladores Th2 e Th17. Busca-se o equilíbrio da resposta do sistema imune, para que se combata o parasita e os danos colaterais ao organismo devido a uma ação inflamatória excessiva sejam minimizados. O composto TD-06 se destacou ao induzir a produção de citocinas dos três perfis.

Devido a gama de perfis imunológicos envolvidos na patologia da doença, existe a importância de se investigar de que maneira um possível novo tratamento pode agir no sistema imunológico, buscando estudar e elucidar a influência do tratamento no sistema imune.

4. CONCLUSÃO

Os compostos testados já haviam passado por uma triagem, mostrando tanto uma baixa citotoxicidade quanto uma boa atividade tripanocida. Agora, os resultados obtidos apontam para uma capacidade quimioterápica dos compostos que foram capazes de ativar respostas de células do sistema imune favoráveis ao combate da doença.

Isso não só nos incentiva a continuar a investigação desses compostos visando encontrar uma nova abordagem terapêutica para a doença de Chagas, como corrobora com a literatura que demonstra a atividade antiparasitária e outras atividades farmacológicas dessa classe química.

5. REFERÊNCIAS

ADAMS, M.; CHIBALE, K.; SMITH, G. S.; DE KOCK, C.; SMITH, P. J.; The synthesis and antiparasitic activity of aryl- and ferrocenyl-derived thiosemicarbazone ruthenium(II)-arene complexes. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 736, p. 19-26, 2013

ALVAREZ, V. E.; NIEMIROWICZ, G. T.; CAZZULO, J. J. The peptidases of *Trypanosoma cruzi*: digestive enzymes, virulence factors, and mediators of autophagy and programmed cell death. **Biochim Biophys Acta**, v. 1824, n. 1, p.195-206, 2012

BERMUDEZ, J.; DAVIES, C; SIMONAZZI, A; REAL, J. P; PALMA, S. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. **Acta Tropica**, v. 156, p. 1-16, 2016.

BOARI, J. T.; VESELY, M. C. A.; BERMEJO, D. A.; RAMELLO, M. C.; MONTES, C. L.; CEJAS, H.; GRUPPI, A.; RODRÍGUEZ, E. V. A. IL-17RA signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. **PLoS Pathogens**, São Francisco, v. 8, n. 4, p. e1002658, 2012.

BONNEY, K. M. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat?. **Parasite**, Paris, v. 21, 2014.

BUCKNER, F. S.; NAVABI, N. Advances in Chagas disease drug development: 2009-2010. **Current opinion in infectious diseases**, Londres, v. 23, n. 6, p. 609, 2010.

DU, X.; GUO, C.; HANSELL, E.; DOYLE, P. S.; CAFFREY, C. R.; HOLLER, T. P.; MCKERROW, J. H.; COHEN, F. E. Synthesis and Structure-Activity Relationship Study of Potent Trypanocidal Thio Semicarbazone Inhibitors of the Trypanosomal Cysteine Protease Cruzain. **J. Med. Chem.**, v. 45, p. 2695-2707, 2002.

DUTRA, W. O.; MENEZES, C. A. S.; MAGALHÃES, L. M. D.; GOLLOB, K. J. Immunoregulatory networks in human Chagas disease. **Parasite Immunology** (Special Issue: Immunology of Human Neglected Parasitic Diseases), v 36, n. 8, p. 377–387, 2014.

GREENBAUM, D. C.; MACKEY, Z.; HANSELL, E.; DOYLE, P.; GUT, J.; CAFFREY, C. R.; LEHRMAN, J.; ROSENTHAL, P. J.; MCKERROW, J. H.; CHIBALE, K. Synthesis and Structure-Activity Relationships of Parasiticidal Thiosemicarbazone Cysteine Protease Inhibitors against *Plasmodium falciparum*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **J. Med. Chem.**, v. 47, p. 3212-3219, 2004.

GUIDO, R. V. C., ANDRICOPULO, A. D., OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, São Paulo, v.24, n.70, p. 81-98, 2010.

HYLAND, K. V.; LEON, J. S.; DANIELS, M. D.; GIAFIS, N.; WOODS, L. M.; BAHK, T. J.; WANG, K.; ENGMAN, D. M. Modulation of autoimmunity by treatment of an infectious disease. **Infection and immunity**, Washington, v. 75, n. 7, p. 3641-3650, 2007.

LEITE, A. C. L.; LIMA, R. S.; MOREIRA, D. R.; CARDOSO, M. V.; BRITO, A. C. G. de; SANTOS, L. M. F. dos; HERNANDES, M. Z.; KIPERSTOK, A. C.; LIMA, R. S. de; SOARES, M. B. Synthesis, docking and *in vitro* activity of thiosemicarbazones, aminoacyl-thiodemicarbazides and acyl-thiazolidones against *Trypanosoma cruzi*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.14, p. 3794-6757, 2006.

SILVA, A. C. C.; SILVA, S. B. da; MENDES, A. P. O.; CASTRO, M. C. A. B. de;

MOREIRA, D. R. M.; LEITE, A. C. L.; PEREIRA, V. R. A. Investigação da atividade tripanocida e citotóxica de candidatos a fármacos antichagásicos. In: EBIT, 4, 2016. Recife, PE. **Anais**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, p. 228-231, 2016.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; SOUZA, W. **Atlas didático**: Ciclo de vida de Trypanosoma cruzi. 1a edição. Rio de Janeiro: Fundação CIERJ, Consórcio CEDERJ, 2011.

TENORIO, R. P.; GÓES, A. J. S.; LIMA, J. G. de; FARIA, A. R. de; ALVES, A. J.; AQUINO, T. M.; Tiossemicarbazonas: métodos de obtenção, aplicações sintéticas e importância biológica. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 28, n. 6, p. 1030-1037, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chagas disease (American trypanosomiasis): Epidemiology. Disponível em: <
<http://www.who.int/chagas/epidemiology/en/http://www.who.int/mediacentre/factsheet/fs340/en/>>. Acesso em: 04.out.2017.

6. AGRADECIMENTOS

A Fiocruz-PE pela bolsa de A. C. C. SILVA e S. B. da Silva.