

## NOVA ABORDAGEM NA QUIMIOTERAPIA DA DOENÇA DE CHAGAS

Diego Silva Menezes\*

**RESUMO:** *A doença de Chagas é uma protozoonose, responsável por afetar aproximadamente 16-18 milhões de pessoas levando ao óbito cerca de 45.000 indivíduos por ano, principalmente nas Américas do Sul e Central. O estresse oxidativo pode resultar em significativas alterações mutagênicas no DNA, podendo causar inibição da proliferação celular. Pesquisas com inibidores de superóxido dismutase, indicam ser este um alvo quimioterápico potencial para diferentes enfermidades, pois estes são importantes na proteção contra o estresse oxidativo. Foram utilizados epimastigotas da cepa Y, cultivados em meio de cultura LIT suplementado com soro fetal bovino na proporção de 10% (v/v) e mantidos em estufas a 26 °C. Os parasitos foram crescidos por 72 horas e foram centrifugados em uma rotação de 2.500 rpm durante 5 minutos. Com o objetivo de abordar o papel da SOD na biologia de *T. cruzi*, incubamos os parasitos com o inibidor da enzima o dietilditiocarbamato de sódio (DETC). Verificamos que este composto inibiu significativamente a proliferação axênica (IC<sub>50</sub> 4,7µM). Foi avaliada a função mitocondrial pela técnica da redução do MTT. As amostras foram fixadas em uma solução contendo 2,5% de glutaraldéido, 4% de paraformaldéido em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 e processadas para análise por microscopia eletrônica de transmissão. Dentre as organelas observadas, as mais afetadas foi a mitocôndria e o retículo endoplasmático, os quais apresentavam dilatações acentuadas, principalmente neste último. As mitocôndrias apresentaram depósitos eletrondensos, possivelmente decorrentes da precipitação de cálcio pelo ferrocianeto de potássio usado na pós-fixação. Estas organelas apresentaram uma significativa redução na atividade mitocondrial. Testes citoquímicos estão sendo realizados, objetivando a determinação do papel biológico da superóxido dismutase na fisiologia de *T. cruzi* e suas possíveis implicações terapêuticas.*

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*; Quimioterapia; Microscopia eletrônica.

## INTRODUÇÃO

Certas parasitoses estão entre as mais prevalentes doenças do mundo, atingindo cerca de milhões de pessoas. Dentre estas, a doença de Chagas é responsável por afetar aproximadamente 16-18 milhões de pessoas, levando a óbito cerca de 45.000 indivíduos por ano (DIAS & BRENER, 1984; WHO, 1997), principalmente nas Américas do Sul e Central, onde 25% da população encontra-se em risco de contrair a doença (GÜRTLER *et al.*, 2003). Estratégias de controle do vetor nas áreas endêmicas têm levado a uma diminuição da transmissão desta doença. Contudo, as infecções congênitas e transfusionais tornaram-se as principais formas de transmissão. Recentemente a mídia divulgou amplamente a transmissão da doença de Chagas por via oral através de caldo-de-cana e açaí, fato que era conhecido (CAMANDAROBA *et al.*, 2002), mas pode estar assumindo nova relevância em diferentes ecótopos. Presumivelmente os

---

\* Acadêmico do Curso de Ciências Biológicas da Universidade Católica do Salvador – UCSAL. Bolsista de Iniciação Científica do Laboratório de Biomorfologia Parasitária e Unidade de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz CPqGM-FIOCRUZ- BA. E-mail: [dmenezes@cpqgm.fiocruz.br](mailto:dmenezes@cpqgm.fiocruz.br). Orientador: Marcos Vannier-Santos, Pós-Doutor em Biologia Celular pela UFRJ, Pesquisador Titular da FIOCRUZ, Chefe do Laboratório de Biomorfologia Parasitária e Unidade de Microscopia Eletrônica do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-CPqGM-FIOCRUZ- BA. E-mail: [vannier@cpqgm.fiocruz.br](mailto:vannier@cpqgm.fiocruz.br).

parasitos exploram novos nichos ecológicos e, assim, faz-se necessária a constante vigilância epidemiológica, bem como a busca de novos regimes terapêuticos.

Os fármacos disponíveis atualmente para o controle da doença são o benzonidazol e o nifurtimox (sendo apenas o primeiro comercializado no Brasil), porém apresentam baixa eficiência e efeitos colaterais importantes (STOPPANI, 1999), como, anorexia, distúrbios gastrointestinais, neuropatias e erupções cutâneas (BERGER *et al.*, 1998). Além de eficácia variável, toxicidade, precauções para uso parenteral prolongado e resistência do parasito (CROFT, 1999). Estes fármacos também não devem ser usadas para o controle da transmissão congênita, sendo um aspecto preocupante devido aos efeitos colaterais causados nas mães e neonatos (GÜRTLER *et al.*, 2003). Para o tratamento de alguns casos de doença de Chagas, têm sido utilizado fármacos antifúngicos da classe dos azóis, entre eles cetoconazol, miconazol, econazol e itraconazol (STOPPANI, 1999; URBINA, 1999).

O *Trypanosoma cruzi* apresenta grande diversidade biológica entre suas cepas, causando uma grande heterogeneidade para respostas aos medicamentos adotados, sendo de fundamental importância o desenvolvimento de fármacos mais efetivos ou combinações com intenção de obter efeitos sinérgicos e/ou aditivos, permitindo terapias mais eficazes e, conseqüentemente, minimizando os efeitos colaterais.

Uma estratégia terapêutica alternativa na quimioterapia da doença de Chagas, que é de total interesse do nosso grupo, é o planejamento racional de drogas que inibam os sistemas de defesa antioxidante. A glutathione é importante agente antioxidante, e os níveis de glutathione em sua forma reduzida são mantidos pela enzima glutathione redutase (GR). Parasitos da família Trypanosomatidae apresentam a maior parte das moléculas de glutathione na forma de um conjugado glutathione-espermidina denominado tripanotiona ( $N^1, N^2$ -bisglutathionil-espermidina), sendo a tripanotiona redutase a principal enzima parasitária que catalisa função redução de grupamentos dissulfeto de resíduos de cisteína. A tripanotiona redutase é uma flavoenzima dependente de NADPH responsável pela manutenção do balanço redox intracelular do parasito para proteção contra o estresse oxidativo, produzido por radicais livres liberados pela célula hospedeira (BONNET *et al.*, 2000). Estudos têm indicado que tripanotiona redutase é fundamental para sobrevivência de *Trypanosoma sp.* e *Leishmania ssp.* e desta forma fármacos como análogos de poliaminas, tiocarbamatos como dietilditiocarbamato de sódio (DETC) tornam-se bastante promissores.

As superóxido dismutases (SODs) formam uma classe muito conservada de metaloenzimas que catalisam a transformação do citotóxico radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), um sub-produto do metabolismo aeróbico e efetor de mecanismos microbicidas, em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, através de alternadas redução e oxidação do metal existente sítio catalítico. Existem duas famílias não homólogas de SODs: uma contendo cobre e zinco no sítio ativo e a outra contendo ferro ou manganês.

A atividade SOD tem um papel relevante em parasitoses, atuando como um potente anti-oxidante que protege os parasitos do ataque imune do hospedeiro, o qual envolve a produção de espécies químicas oxidantes, tais como o radical superóxido. Muitos parasitos, de fato, contêm esse anti-oxidante, o que torna justificável o planejamento racional de drogas envolvendo a inibição da superóxido dismutase no *Trypanosoma cruzi*. Desta forma, neste trabalho testamos o papel de antagonistas da atividade superóxido dismutase em presença e ausência de benzonidazol.

Assim sendo, tanto o surgimento de novas cepas de *T. cruzi* resistentes às drogas atualmente disponíveis em nosso arsenal terapêutico quanto os efeitos colaterais destas demonstram a necessidade do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Tivemos como objetivo avaliar *in vitro* o(s) mecanismo(s) de ação de inibidores da atividade SOD, como os tiocarbamatos, na sobrevivência deste parasito, verificando a

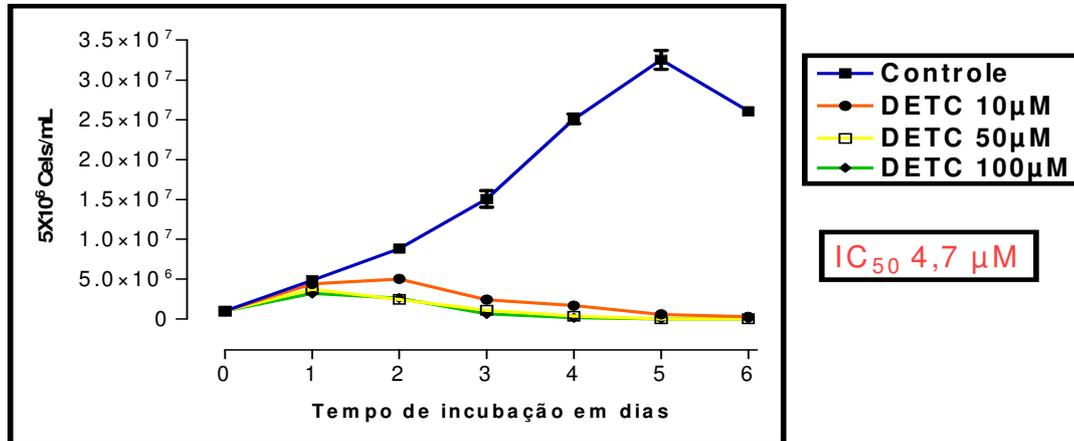
possibilidade de ocorrência de mecanismos de ação aditivos e/ou sinérgicos entre os fármacos dietilditiocarbamato de sódio e benzonidazol para tentar obter uma maior eficácia no tratamento e/ou diminuição dos efeitos colaterais que são causados pelos fármacos utilizados devido a suas altas concentrações e avaliar uma possível atividade anti-*Trypanosoma*.

Para realização dos experimentos, epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* da cepa “Y” foram mantidas axenicamente em meio de cultura LIT (infusão de fígado e triptcase) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino e 1% de hemina, a 26 °C. Curvas de crescimento com um inóculo inicial de  $5 \times 10^6$  parasitos/mL em meio LIT e incubados a 26 °C na presença e ausência de drogas como benzonidazol (fornecido por Farmanguinhos, FIOCRUZ, Rio de Janeiro), dietilditiocarbamato de sódio (SIGMA Chemical Co.) em concentrações variadas. Sendo acompanhado o crescimento por 168 horas (7 dias). Para verificar a função mitocondrial, os parasitos foram adicionados em meio de cultura LIT em um inóculo de  $10^7$ /mL e tratados com diferentes concentrações e combinações de drogas por 24 horas. Células tratadas e não tratadas foram lavadas re-inoculadas em meio de cultura novo, contendo 10% v/v de brometo de 3-(4,4-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dieniltetrazólio (MTT) e incubado por 3 horas. As células foram centrifugadas, os sedimentos ressuspensos em dimetilsulfóxido (DMSO) e transferidos para cubetas. Os precipitados de formazam derivados da redução do MTT foram determinados espectrofotometricamente a 570 nm. Cubetas contendo MTT e DMSO foram utilizados como controle.

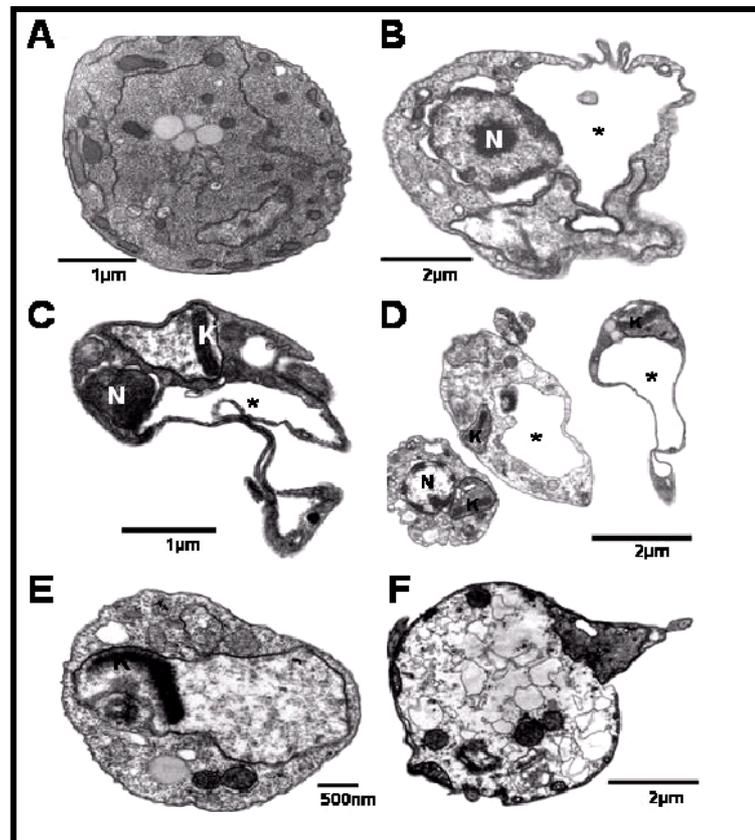
Após os tratamentos, os parasitos foram lavados e fixados em solução de 2,5% de glutaraldeído grau II, 4% de formaldéido em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 2-24 hora à temperatura ambiente. Depois de fixadas, as células foram lavadas 3 vezes no mesmo tampão e pós-fixadas em tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 1% e ferricianeto de potássio 0,8% no mesmo tampão por 40 minutos em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Após isso, as amostras foram lavadas no mesmo tampão e desidratadas em concentrações crescentes de acetona por 15 minutos cada. As células foram então progressivamente incluídas em resina epóxi Polybed (Polysciences, Inc). Após, então, as amostras foram posicionadas em resina pura com catalisador Mp-28 em moldes apropriados e mantidas por 72 horas em a 60°C. Cortes ultrafinos do material foram obtidos no ultramicrotomo (Reichert, Leica), coletados em grades de cobre de malha 300. Contrastados em acetato de uranila 5% em água por 15 minutos e citrato de chumbo 3-5 minutos, seguidos de três lavagens em água destilada. As grades foram observadas ao microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss 109).

## DESENVOLVIMENTO

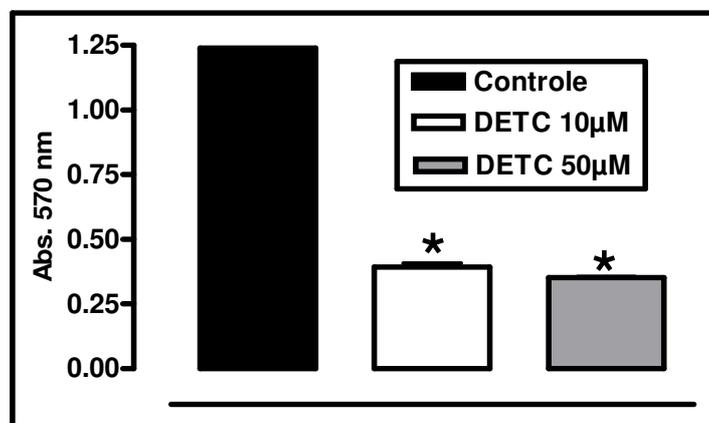
O dietilditiocarbamato de sódio demonstrou causar acentuada redução na proliferação *in vitro* de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, apresentando um  $\text{IC}_{50}$  (concentração inibitória de 50%) de aproximadamente  $4,7 \mu\text{M}$  (FIG. 1). Na tentativa de elucidar os mecanismos de ação deste fármaco, foi aplicada microscopia eletrônica de transmissão. Na concentração de  $200 \mu\text{M}$  o dietilditiocarbamato de sódio causou completa desorganização celular (FIG. 2). Dentre as organelas alteradas, a mitocôndria e o retículo endoplasmático foram os que apresentaram maior alteração. Ambas as organelas apresentaram-se extremamente dilatadas, e a função mitocondrial, acessada pela técnica do MTT, foi significativamente ( $P < 0,001$ ) reduzida (FIG. 3).



**Figura 1:** Curva de crescimento e determinação da concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>), utilizando o programa GraphPad Prism 4.



**Figura 2:** Eletromicrografias de transmissão de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* tratadas e não tratadas com 0,2mM dietilditilcarbamato de sódio (DETC): (A) Controle, parasitos incubados com DETC demonstrando enorme dilatação de retículo endoplasmático (B-D), (C-E) dano mitocondrial, com desfragmentação do K-DNA e grande vacuolização citoplasmática (F).



**Figura 3:** Avaliação de atividade mitocondrial medida pela técnica de MTT. ( $P < 0,001$  “A NOVA” paramétrico GraphPad Prism 4)

## CONCLUSÕES

Os dados obtidos até o momento indicam fortemente que o dietilditiocarbamato de sódio é capaz de produzir estresse oxidativo, bloqueando mecanismos antioxidantes parasitários enzimáticos ou não enzimáticos. Entretanto novos experimentos estão sendo realizados para podermos inferir melhor sobre o(s) mecanismo(s) de ação deste fármaco, pois indicam que podem constituir importantes ferramentas no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas na doença de Chagas.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, S.G. & FREITAS, L.A. *Trypanosoma cruzi*: cardiac myocells alterations due to spontaneous or therapeutically induced intracellular parasite disintegration. **Cell Mol Biol** 33, 797-805, 1987.

BOOBIS, A.R., FAWTHROP, D.J. & DAVIES D.S. Mechanisms of cell death. **Trends Pharmacol Sci** 10, 275-280, 1989.

CAMANDAROBA, E., PINHEIRO-LIMA C.M. & ANDRADE S.G. Oral transmission of chagas disease: importance of *Trypanosoma cruzi* biotome in the intragastric experimental infection. **Rev Inst Med Trop S Paulo** 44, 97-103, 2002.

COURA, J.R, JUNQUEIRA, A.C.V., FERNANDES, O., VALENTE, S.A.S. & MILES, M.A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends Parasitol** 18, 171-176, 2002.

COURA, J.R. Epidemiologic determinants of Chagas' disease in Brazil: the infection, the disease and its morbidity/mortality. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 83, 392-402, 1988.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des** 8, 269-285, 2002.

DOCAMPO, R. & STOPPANI, A.O. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. **Arch Biochem Biophys** 197, 317-321, 1987.

GADELHA, F.R., MORENO, S.N., DE SOUZA, W., CRUZ, F.S. & DOCAMPO, R. The mitochondrion of *Trypanosoma cruzi* is a target of crystal violet toxicity. **Mol Biochem Parasitol** 34, 117-126, 1989.

GORLA N.B., LEDESMA O.S., BARBIERI G.P. & LARRIPA I.B. Assessment of cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole. **Mutat Res** 206, 217-220, 1989.

MAYA, J.D., BOLLO, S., NUÑEZ-VERGARA, L.J., SQUELLA, J.A., REPETTO, Y., MORELLO, A. PÉRIÉ, J. & CHAUVIÈRE, G. *Trypanosoma cruzi*: effect and mode of action of nitroimidazole and nitrofurán derivatives. **Biochem Pharmacol** 65, 999-1006, 2003.

NIHEI, C., FUKAI, Y. & KITA, K. *Trypanosome* alternative oxidase as a target of chemotherapy. **Biochim Biophys Acta** 1587, 234-239, 1997.

SOUSA, S.C., MACIEL, E.N., VERCESI, A.E. & CASTILLO, R.F. Ca<sup>2+</sup>-induced oxidative stress in brain mitochondria treated with the respiratory chain inhibitor rotenone. **FEBS Lett** 543, 179-183, 2003.

VANNIER-SANTOS M.A., MARTINY A. & DE SOUZA W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Curr Pharm Des** 8, 297-318, 2002.

VANNIER-SANTOS M.A., MARTINY A., LINS U., URBINA J.A., BORGES V.M. & DE SOUZA W. Impairment of sterol biosynthesis leads to phosphorus and calcium accumulation in *Leishmania* acidocalcisomes. **Microbiology** 145, 3213-3220, 1999.

VANNIER-SANTOS, M.A., URBINA, J.A., MARTINY, A., NEVES, A. & DE SOUZA, W. Alterations induced by the antifungal compounds ketoconazole and terbinafine in *Leishmania*. **J Euk Microbiol** 42, 337-346, 1995.