



Serviço Público Federal
Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS ALIMENTOS E NUTRIÇÃO – FACFAN
Curso de Farmácia

PIETRA PERONDI SATER

**Efeitos da combinação de Levamisol e Lansoprazol sobre
formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***

Campo Grande - MS
2023

PIETRA PERONDI SATER

**Efeitos da combinação de Levamisol e Lansoprazol sobre
formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***

Trabalho de conclusão de curso apresentado
como requisito parcial para graduação no curso
de Farmácia da UFMS.

Orientador: Profa Dra. Alda Maria Teixeira
Ferreira

Campo Grande – MS
2023

AGRADECIMENTOS

Toda honra e toda glória Àquele que me sustentou até aqui. Sem Cristo não sou nada.

Agradeço à minha família, que acreditou em mim e me incentivou a finalizar este ciclo com excelência. Em especial, minha mãe Alessandra por ter me acomodado em uma nova cidade; meu padrasto, Ton, meu maior incentivador a viver uma vida na pesquisa; meu irmão Breno, a quem admiro fielmente; minha irmã Thais que me inspira a viver uma vida com leveza; e meu pai Jaffar e madrastra Aline, duas pessoas inspiradoras com quem não tem ruim.

Agradeço à minha prima, Aline, que é uma segunda mãe e carrega com ela uma alegria de viver contagiante. Me acolheu como sua filha e nunca me deixou desamparada.

Agradeço aos meus amigos, Luiz, Lorena, Gabrielle, Rafael, João Victor, Lucas e Jonas que foram minha grande família durante este período e nunca me deixaram sozinha, sempre me alegraram quando precisei. É impossível ficar triste na companhia deles.

Agradeço à minha amiga e companheira de laboratório, Milena, que me trouxe conforto, muita risada e fez tudo ficar menos difícil. Não sei como eu passaria por tudo isso sem ela.

Agradeço à minha amiga de casa, Gabriela Sardinha, que mesmo longe se fez presente e compartilhou comigo todas as dificuldades da graduação. Sua amizade é minha lembrança de lar.

Agradeço à família Bernardes Leite, que também me acolheram como filha e me incentivaram a ser minha melhor versão, sempre correndo atrás dos meus sonhos e vibrando comigo em cada conquista.

Agradeço à minha Professora e orientadora Alda, que não somente acreditou em mim e no meu potencial, mas me guiou durante as experiências mais incríveis que tive na graduação.

Agradeço aos meus Professores Alessandra Gutierrez e Davi Campos La Gatta por terem aceitado meu convite para a banca. Dois professores excelentes por quem carrego muita admiração. Em especial ao Davi, com quem tive a oportunidade de compartilhar minhas frustrações e incertezas e recebi nada além de conselhos incríveis e muito incentivo. Obrigada, Professor.

Por fim, agradeço à UFMS, Universidade que me permitiu sonhar, crescer, realizar sonhos e encontrar pessoas das quais jamais vou me esquecer.

Obrigada!

RESUMO

Descoberta há mais de 100 anos atrás pelo médico brasileiro Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (1879-1934), a doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase americana, cujo agente etiológico é o protozoário *Trypanosoma cruzi*, está entre as principais Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs). Atualmente, os fármacos disponíveis no mercado são Benznidazol e Nifurtimox, desenvolvidos nos anos 70, eficazes na fase aguda, entretanto, ambos têm sua eficácia diminuída conforme o tempo de infecção aumenta e frequentes reações adversas. Este cenário é um grande contribuinte para a comunidade científica buscar novas alternativas e possíveis estratégias para o tratamento da doença. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos da combinação entre os fármacos Levamisol e Lansoprazol sobre formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa Dm28c. Levamisol é um fármaco comumente usado como anti-helmíntico e potente atividade imunomoduladora. Lansoprazol é um inibidor da bomba de prótons gástrica, indicado para cicatrização e alívio sintomático da esofagite de refluxo. Com base em dados obtidos recentemente pelo LabImunoBio (UFMS), o fármaco Lansoprazol apresenta atividade biológica contra diferentes formas de vida de *T. cruzi* Dm28c, e portanto, se tornou um promissor alvo de estudos para o reposicionamento de fármacos. Foram então realizados ensaios de combinação utilizando diferentes concentrações de ambos fármacos, a partir disso, a viabilidade celular dos parasitos foi analisada por observação e determinada por meio do ensaio de MTS. Os resultados deste trabalho teve o intuito de determinar a classificação segundo Chou (2006), em: forte sinergismo; sinergismo; sinergismo moderado; e quase aditivo, para que assim, pudesse ser avaliada a melhor combinação entre os dois fármacos determinando o índice de combinação da melhor associação.

Palavras-chave: doença de Chagas; *Trypanosoma cruzi*; Levamisol; Lansoprazol.

ABSTRACT

Discovered more than 100 years ago by the Brazilian doctor Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (1879-1934), Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, whose etiological agent is the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is among the main Neglected Tropical Diseases (NTDs). Currently, the drugs available on the market are Benznidazole and Nifurtimox, developed in the 1970s, effective in the acute phase, however, both have their effectiveness reduced as the time of infection increases and adverse reactions become more frequent. This scenario is a major contributor to the scientific community to seek new alternatives and possible strategies for the treatment of this disease. This work aims to evaluate the effects of the combination of Levamisole and Lansoprazole on epimastigote forms of Dm28c strain of *T. cruzi*. Levamisole is a drug commonly used as an anthelmintic and has potent immunomodulatory activity. Lansoprazole is a gastric proton pump inhibitor, advised for healing and symptomatic relief of reflux esophagitis. Based on data recently obtained by LabImunoBio (UFMS), the drug Lansoprazole shows biological activity against different life forms of *T. cruzi* Dm28c, and has therefore become a promising target for drug repositioning studies. Combination trials were then carried out using different concentrations of both drugs, after which the cell viability of the parasites was analyzed by observation and determined by MTS assay. The results of this work had the intention to determine the classification according to Chou (2006) as: strong synergism; synergism; moderate synergism; and almost additive, so that the best combination between the two drugs could be assessed, determining the combination index of the best association.

Keywords: Chagas disease; *Trypanosoma cruzi*; Levamisole; Lansoprazole.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DTN	Doença Tropical Negligenciada
DC	Doença de Chagas
BZN	Benznidazol
NF	Nifurtimox
PM	Peso molecular
IC₂₅	Concentração inibitória (concentração necessária para inibir/matar 25% dos parasitas)
IC₅₀	Concentração inibitória média (concentração necessária para inibir/matar 50% dos parasitas)
IC₇₅	Concentração inibitória (concentração necessária para inibir/matar 75% dos parasitas)
IC₉₀	Concentração inibitória (concentração necessária para inibir/matar 90% dos parasitas)
DMSO	Dimetilsulfóxido
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida e infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2021.

Figura 2: Estrutura química dos fármacos Nifurtimox e Benznidazol. (Davanço, 2015).

Figura 3: Esquema do composto MTS sendo reduzido à Formazan por desidrogenase (Kuetze, 2017)

Figura 4: Esquema geral da microplaca após ensaio MTS, onde as proporções estão indicadas, e as concentrações em $\mu\text{g/mL}$ estão indicadas em branco no topo esquerdo da placa.

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Preparação dos parasitas em meio LIT e diluição inicial dos fármacos – Criado em BioRender.com

Esquema 2: Diluição para as concentrações úteis dos fármacos – Criado em BioRender.com

Esquema 3: Preparação das proporções em eppendorf e aplicação na microplaca – Criado em BioRender.com

Esquema 4: Aplicação em microplaca – Criado em BioRender.com

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: IC_{25} ; IC_{50} ; IC_{75} ; e IC_{90} das três combinações de atividade antiparasitária positiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	OBJETIVOS	3
2.1	Objetivo geral	3
2.2	Objetivos específicos.....	3
3	REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1	Epidemiologia	4
3.2	Agente Etiológico e Ciclo de Vida	4
3.3	Formas Clínicas e Diagnóstico	6
3.4	Tratamento	6
3.5	Reposicionamento de fármacos.....	8
3.6	Estudos <i>in silico</i> e <i>docking</i> molecular	8
3.7	Ensaio MTS.....	9
4	MATERIAIS E MÉTODOS	9
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
6	CONCLUSÃO	17
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	18

1 INTRODUÇÃO

Reconhecida pela OMS como uma das treze Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) do mundo, a doença de Chagas (DC) é causada pelo protozoário da espécie *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) e tem acometido a humanidade desde a antiguidade, permanecendo como um relevante problema social e econômico em muitos países no mundo, nos quais apresenta caráter endêmico com incidência anual de 30 mil novos casos, estima-se que de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas com o protozoário, onde a maioria está concentrada na América Latina (OMS, 2019). No Brasil, estima-se que um milhão de pessoas tenham sido infectadas pelo *T. cruzi*, em algum momento de sua vida. Somente em 2017 foram registrados mais de 4 mil óbitos tendo como causa básica a doença de Chagas (Ministério da Saúde, 2020).

Face a esse panorama, a farmacoterapia atual e disponível para o tratamento da DC é constituída de apenas dois medicamentos, Benznidazol (BZN) e Nifurtimox (NF), que foram descobertos há mais de quatro décadas e têm sua eficácia diminuída na fase crônica da doença, além de possuírem potencial tóxico e causarem diversos efeitos colaterais (Dias et al., 2016; OMS, 2018).

A busca por alternativas para o tratamento da doença de Chagas tem sido intensificada pela comunidade científica. A estratégia de investigação *in silico* para o estudo de reposicionamento de fármacos tem sido utilizada por nosso Grupo como forma de direcionar os ensaios para a investigação de atividade biológica frente ao agente etiológico da DC. Além disso, alguns fármacos e suas associações têm sido utilizados para ensaios *in vivo* e *in vitro*, inclusive envolvendo estudos clínicos, porém ainda sem muito sucesso (Rassi et al., 2010). Nesse contexto, o reposicionamento de fármacos tem gerado grande interesse e se tornado uma estratégia importante nas indústrias farmacêuticas e nos centros de pesquisa, baseando-se na descoberta de novas utilizações para fármacos já aprovados (Andrews et al., 2014; Ashburn & Thor, 2004). Com base em dados obtidos recentemente, o fármaco Lansoprazol apresentou atividade biológica contra diferentes formas de vida de *T. cruzi* Dm28c, e portanto, se mostrou promissor como alvo de estudo nesta proposta. Este trabalho traz a combinação deste fármaco, juntamente com o Levamisol.

O Lansoprazol é um fármaco da classe dos inibidores de bomba de prótons, estruturalmente classificado como benzimidazol substituído, sendo este último um composto orgânico aromático e heterocíclico. Seu alvo de ação é uma enzima que catalisa a etapa final da secreção de ácido gástrico nas células parietais. É eficaz no tratamento de úlceras gástricas e no tratamento da doença do refluxo esofágico, além de outras patologias que envolvam excesso de secreção ácida (Barradell et al., 1992; Shin & Sachs, 2008).

O Levamisol, um anti-helmíntico sintético utilizado em mamíferos (Jecfa, 1991), conhecido por suas características imunoestimulantes (Renoux, 1980), tem apresentado capacidade de modular a resposta imune em diversos organismos, aumentando a resistência contra agentes etiológicos bacterianos, protozoários e nematoides (Kajita et al., 1990; Baba et al., 1993; Findlay et al., 2000; Munday e Zilberg, 2003; Geets et al., 1992). Diversos estudos têm demonstrado que diferentes parâmetros imunológicos, tanto *in vivo* como *in vitro* podem ser modulados pelo Levamisol (O'Connell et al. 2006; Holcombe et al. 2006; Bisalla et al. 2009; Sayad et al. 2012).

Diante do cenário atual e que se estende há muito tempo, é de grande relevância a pesquisa dentro da área de reposicionamento de fármacos. Tanto o Benznidazol quanto o Nifurtimox são medicamentos quase 100% eficazes no tratamento da doença, porém somente se forem administrados no início da fase aguda e outros casos em que a infecção foi reativada devido à imunossupressão em pacientes durante a fase inicial crônica (OMS, 2023). Uma realidade bem mais presente é o desconhecimento da doença, cerca de 70% das pessoas com Chagas não sabem que estão infectadas. (OPAS, 2021). Isso contribui para o surgimento das reações adversas já relatadas com o uso destes medicamentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste estudo foi avaliar os efeitos *in vitro* da associação de Levamisol e Lanzoprazol sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Definir a melhor concentração de cada fármaco da associação;
- Avaliar a viabilidade metabólica de formas epimastigotas de *T.cruzi* após tratamento com a combinação de fármacos;
- Determinar IC₂₅; IC₅₀; IC₇₅; e IC₉₀;
- Determinar o Índice de Combinação (IC) da melhor associação;

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Epidemiologia

Causadas por agentes parasitários como vírus, bactérias, protozoários, e helmintos, as doenças negligenciadas estão extensamente presentes em países da América Latina. Principalmente em locais rurais, onde há moradias de adobe (construções com terra, palha e água), geralmente pessoas de baixa renda e com pouquíssimo acesso à saneamento básico. A doença de Chagas, reconhecida como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN) somente em 2005 pela OMS, mata mais pessoas na América Latina, onde é endêmica, cada ano do que qualquer outra doença parasitária, incluindo malária. Entretanto, a imigração de pessoas infectadas de países endêmicos para países desenvolvidos, torna esta doença uma ameaça a saúde global. Atualmente, a DC está presente, porém não endemicamente, na América do Norte, Europa, Japão e Austrália (DNDi, 2022).

3.2 Agente Etiológico e Ciclo de Vida

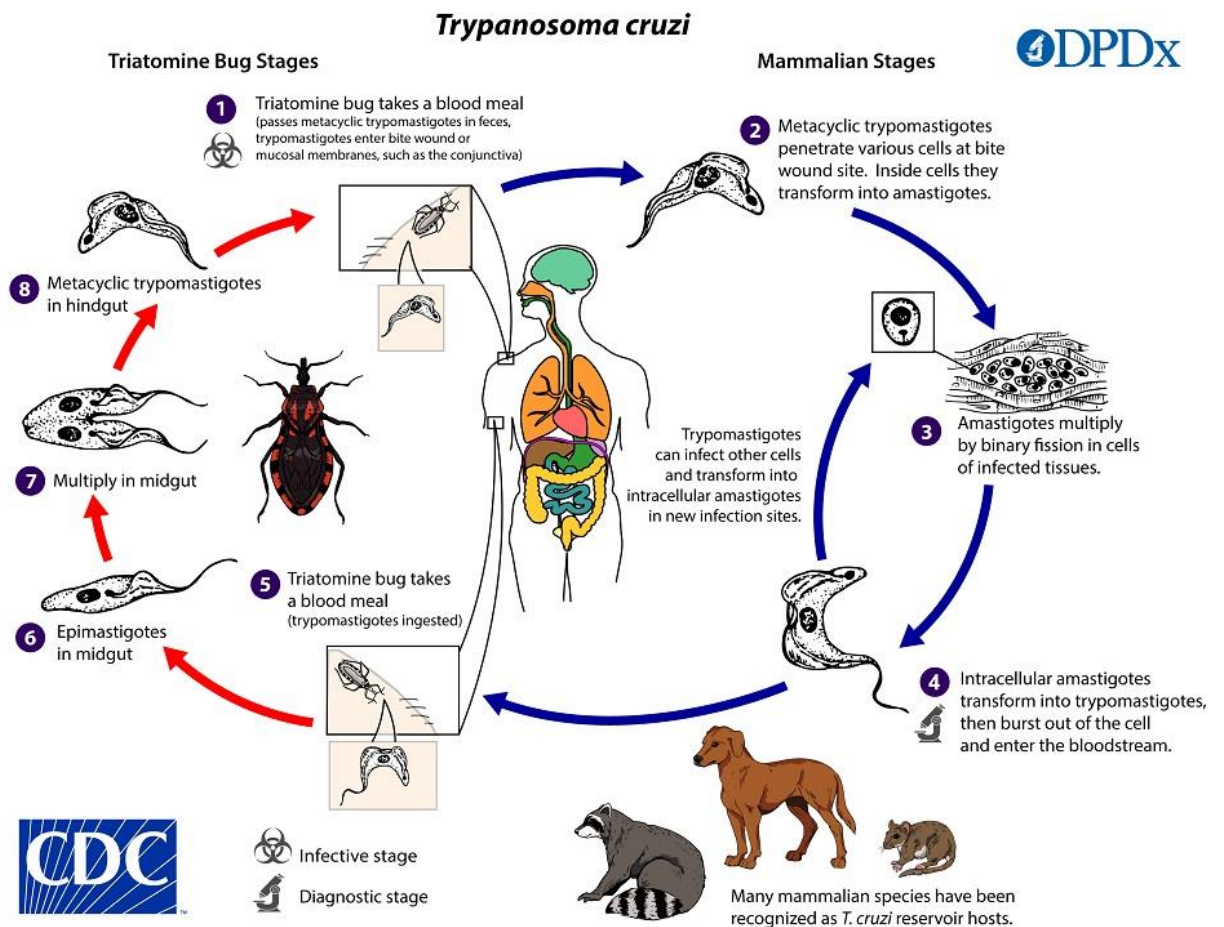
O agente causador da também conhecida como Tripanossomíase americana, é um protozoário unicelular flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Trypanosoma*. Com base no comportamento do parasito nos seus hospedeiros, principalmente no vetor, sendo o principal, o inseto triatomíneo (barbeiro), o gênero *Trypanosoma* foi dividido em dois grupos. O primeiro, chamado de Stercoraria, inclui tripanosomas que se desenvolvem no tubo digestivo do vetor, responsável por liberar formas infectantes pelas fezes, onde neste grupo estão *T. cruzi* e *T. lewisi*. São heteroxênicos, isso significa que alteram seu ciclo de vida entre hospedeiros. O segundo grupo desta subdivisão, chamado de Salivaria, engloba os parasitos que estão inicialmente no tubo digestivo do vetor e que posteriormente atravessam o epitélio digestivo atingindo as glândulas salivares onde encontramos as formas infectantes, transmitidas mecanicamente, onde estão: *T. brucei*, *T. congolense* e *T. rangeli* (Portal da Doença de Chagas, 2017).

A transmissão do *Trypanosoma cruzi* ocorre principalmente pelo contato dos dejetos do barbeiro, que ao se alimentar de sangue humano, o inseto defeca ou urina próximo à picada. É quando, ao coçar esta região, que o indivíduo coloca em contato os parasitos presentes nestes dejetos com a ferida da picada, ou até mesmo olhos ou boca. Além desta, a DC também pode ser transmitida pelo consumo de comida contaminada (açai, caldo de cana, entre outros); transfusão de sangue ou derivados sanguíneos de

doadores infectados; congênita (durante gravidez ou parto); transplantes de órgãos infectados; e acidentes em laboratórios (OMS, 2023).

O ciclo de vida do *T. cruzi* começa com o triatomíneo infectado, que se alimenta de sangue humano e libera seus dejetos com parasitos na sua forma tripomastigota. Assim que os parasitos entram em contato com a ferida ou com a mucosa, eles invadem as células próximas à inoculação, onde eles se diferenciam em amastigotas, que vão se multiplicar por fissão binária para posteriormente se diferenciar em tripomastigotas novamente e serem liberadas para a corrente sanguínea. A partir daí, as tripomastigotas irão infectar uma variedade de tecidos e se transformarem em amastigotas intracelulares, novamente. Diversos sinais e sintomas são provocados ao desenvolver deste ciclo no hospedeiro vertebrado, uma vez que é onde as formas amastigotas se multiplicam dentro da célula do tecido. Somente quando elas se transformarem em tripomastigotas e eclodirem da célula, estas novas formas irão para a corrente sanguínea para infectar novos tecidos (CDC, 2021).

Figura 1: Ciclo de vida e infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2021.



3.3 Formas Clínicas e Diagnóstico

Os sinais e sintomas da DC são divididos em 2 fases: aguda e crônica. A fase aguda é caracterizada por uma alta parasitemia e na maioria dos casos, os sintomas são leves e inespecíficos, onde menos de 50% das pessoas picadas pelo barbeiro apresentam sinais visíveis e característicos da doença (OMS, 2023). Um sinal visível, conhecido como “Sinal de Romana”, é o edema da pálpebra, quando a contaminação ocorre pela mucosa ocular. Além deste, a sintomatologia da fase aguda pode incluir: febre, cefaleia, palidez, dores musculares, aumento das glândulas linfáticas, dificuldade em respirar, inchaço e dor abdominal.

A fase crônica é caracterizada pelo parasito em grande quantidade nos tecidos, ele já está em sua forma intracelular e se multiplicando de forma rápida. Os principais tecidos atingidos são o coração e o músculo digestivo, por isso, as alterações são principalmente cardíacas e digestivas além de neurológicas, ou até mesmo mistas. As lesões cardíacas incluem cardiomiopatia, cardiomegalia, arritmias, e insuficiência cardíaca, enquanto que as lesões digestivas são principalmente aumento do esôfago, estômago, ou cólon (Gullo, 2012).

A anamnese nem sempre aponta a DC, apesar de ser de grande importância. A detecção do parasito pode ser feita por métodos laboratoriais direta ou indiretamente pela presença de anticorpos contra o parasito no soro, ou até mesmo pela observação do protozoário no sangue do paciente (extensão manual, ou esfregaço e gota espessa). Os testes imunológicos a serem realizados incluem: imunofluorescência indireta (IFI); hemaglutinação indireta (HAI), e interação antígeno-anticorpo (Imunoenzimático-ELISA). Outros testes como PCR (reação em cadeia da polimerase) e Western Blot também podem servir de alternativa. Gestantes procedentes ou residentes em região endêmica de DC devem fazer pelo menos dois testes sorológicos anti *T. cruzi* na primeira consulta pré-natal.

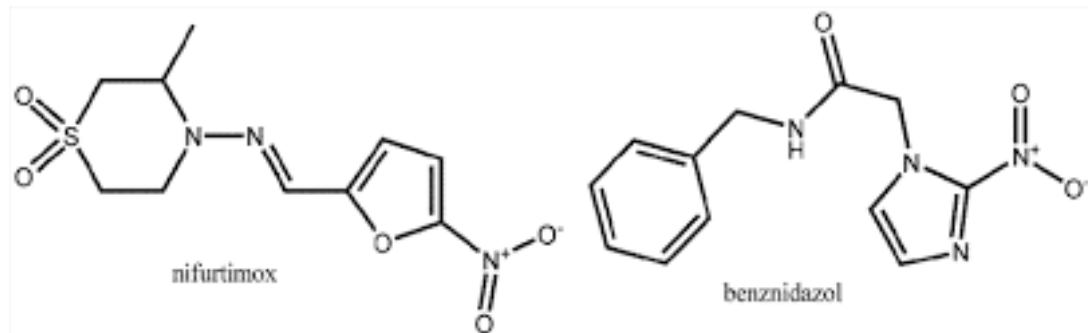
A indicação de um diagnóstico também pode ser realizado pelo teste rápido, que é referência ao *Point of Care Testing*, que inclui uma gama de testes rápidos que podem ser feitos em lugares de pronto atendimento e por profissionais sem necessidade de especialização, uma vez que são de fácil operação (Iturra, 2023). O rápido diagnóstico coopera para um tratamento bem sucedido com os fármacos disponíveis no mercado para a DC.

3.4 Tratamento

Os dois únicos fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas são

Benznidazol e Nifurtimox. O mecanismo de ação dos dois ainda é pouco sabido, entretanto, ambos são pró-fármacos ativados por uma nitroredutase da mitocôndria do parasita.

Figura 2: Estrutura química dos fármacos Nifurtimox e Benznidazol. (Davanço, 2015).



O Benznidazol (PM = 260.25 g/mol) é um derivado de nitroimidazol, considerado primeira linha uma vez que tem melhor tolerância (Meymandi, 2018). Em uma revisão sistemática atualizada com meta-análise tratando do uso de BZN para o tratamento da doença de Chagas em sua forma crônica publicada em 2022, os autores Crespillo-Andújar, et al discutem que há benefício no tratamento da DC com BZN com uma segurança moderada quando o foco é a soroconversão em crianças, entretanto, em adultos, os estudos não indicaram eficácia quando o foco é em pacientes com cardiomiopatia (moderada segurança), uma das consequências da infecção crônica da doença. Por outro lado, a meta-análise indicou uma qualidade de evidência fraca quando o uso de BZN é focado em pacientes sem envolvimento visceral da doença, demonstrando apenas um efeito positivo marginal no melhor caso estudado.

O Nifurtimox (PM = 287.29 g/mol) é um composto nitrofurano, que além de ser contraindicação para mulheres grávidas como o BZN, ele é contraindicado também para pacientes com distúrbios neurológicos ou psiquiátricos (OMS, 2023). Entre poucos estudos divulgados sobre a eficácia do fármaco Nifurtimox, um estudo de coorte retrospectivo de longo prazo em crianças e adultos, realizado em 2022, traz uma discussão ampla sobre este assunto. Os autores N. Falk, et al concluem que há uma depuração antiparasitária relevante induzida pelo NF tanto em crianças quanto em adultos, fortalecendo o fato de que há cura para pacientes que iniciam o tratamento logo após a infecção.

Estes fármacos são mais eficazes no início da doença (fase aguda inicial), e em períodos diferentes deste, ambos têm eficácia diminuída. É comum a interrupção do uso destes medicamentos por conta própria do paciente devido à vasta lista de efeitos adversos como: anorexia, náuseas, cefaleia, depressão do sistema nervoso central, parestesia (formigamentos nas mãos, pés, pernas, braços e outros membros) e até

mesmo convulsões. Além disso, algumas cepas do protozoário podem ser resistentes a estes fármacos (García-Huertas, 2021). Em frente a isto, o diagnóstico precoce, tratamento nas fases iniciais da doença, são cruciais para maximizar o benefício dos fármacos atualmente disponíveis (Crespillo-Andújar, et al. 2022). Há cura caso o tratamento seja iniciado logo após a infecção (OMS, 2023).

3.5 Reposicionamento de fármacos

Devido ao cenário atual, apesar dos efeitos positivos comprovados da farmacoterapia atual direcionada à doença de Chagas em circunstâncias específicas do paciente, diversas alternativas têm sido estudadas para o tratamento e possível cura da DC. Entre elas, o reposicionamento de fármacos, que consiste em uma nova indicação de uso de fármacos já conhecidos, estudados e disponíveis no mercado para o tratamento de uma determinada doença baseado em seus efeitos farmacológicos/biológicos, ou em seus efeitos adversos (Jourdan, 2020). Espera-se com esta e outras estratégias encontrar um novo fármaco que atue como tripanocida, assim como BZN e NF, ou uma possível combinação sinérgica que seja eficiente, diminuindo o tempo de uso dos medicamentos, que atualmente é de cerca de oito semanas (DNDi, 2023), ou até mesmo substituir os medicamentos atuais por outros menos tóxicos e mais eficazes durante a fase crônica.

O reposicionamento de fármacos é uma maneira econômica na busca de novos fármacos uma vez que não exige modificações na molécula para que ela possa ser indicada para um novo uso. Em vez disso, podem ser modificadas a dose e via de administração. É necessário um estudo de elucidação e de possíveis alvos do fármaco a ser reaproveitado para que ele seja escolhido de forma não-aleatória. Para isto, abordagens *in silico* são a chave para o reposicionamento de fármacos (Jourdan, 2020), também chamado de reaproveitamento de fármacos.

3.6 Estudos *in silico* e *docking* molecular

O estudo *in silico* trata-se de uma abordagem conhecida como “screening” virtual, onde é feita uma triagem focada no alvo molecular sendo destacada como um grande avanço da bioinformática. Modelos computacionais predizem o reconhecimento de uma molécula por um receptor a partir de um banco de dados de moléculas e proteínas. Esta é a base do desenvolvimento de software para triagens *in silico* (Lima, 2007).

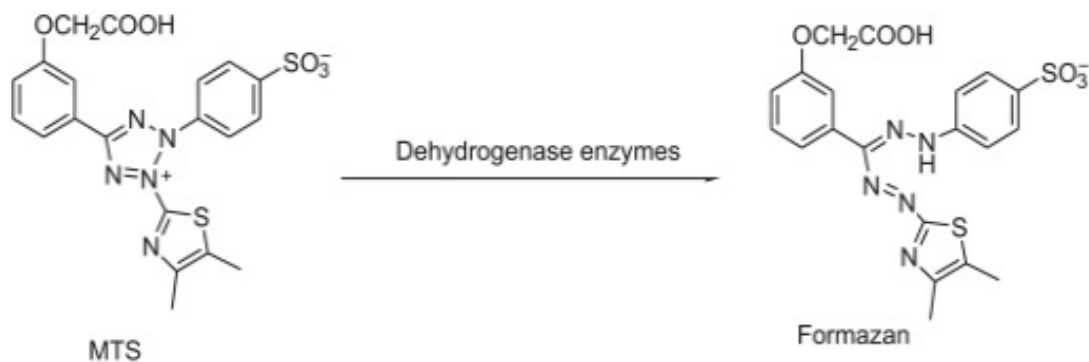
Apesar de ser uma aplicação que acelera o processo de identificação de ligantes, o estudo de Lima, 2007 traz que fatores entrópicos e entálpicos não são levados em

consideração, como presença de moléculas de água, flexibilidade do ligante e sítio de interação. Estes fatores podem afetar a afinidade prevista pelo *docking* molecular (atracamento molecular).

3.7 Ensaio MTS

O ensaio MTS é um ensaio de viabilidade celular que utiliza de um corante de tetrazólio, (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio), que em contato com a mitocôndria funcional do parasita, forma um composto conhecido como Formazan. Também visto como ensaio MTT de um passo só, o MTS é realizado em conjunto com PMS, metanosulfato de fenazina, que funciona como um acoplador de elétrons intermediário, transferindo elétrons do NADH no citoplasma para reduzir o MTS em Formazan solúvel. O Formazan é um produto de coloração roxa que indica viabilidade celular, portanto, quanto mais roxo o poço da microplaca, mais vida parasitária está disponível.

Figura 3: Esquema do composto MTS sendo reduzido à Formazan por desidrogenase (Kuetze, 2017)



4 MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* Dm28c foram mantidas em cultura a 28 °C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), com repiques periódicos. Para os experimentos foram utilizados parasitas em fase exponencial de crescimento.

Fármacos

Lansoprazol: Lansoprazole, LAN, 2-[[[3-Methyl-4-(2,2,2-trifluoroethoxy)-2-pyridinyl]methyl]sulfinyl]-1H-benzimidazole. CAS: 103577-45-3.

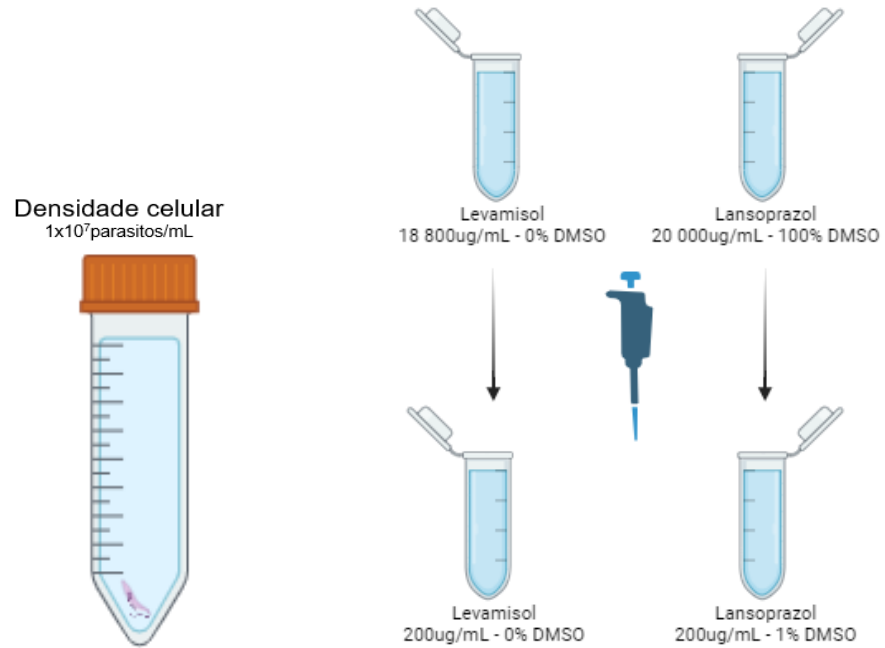
Levamisol: Levamisole hydrochloride. CAS: 16595-80-5.

Ensaio de Combinação

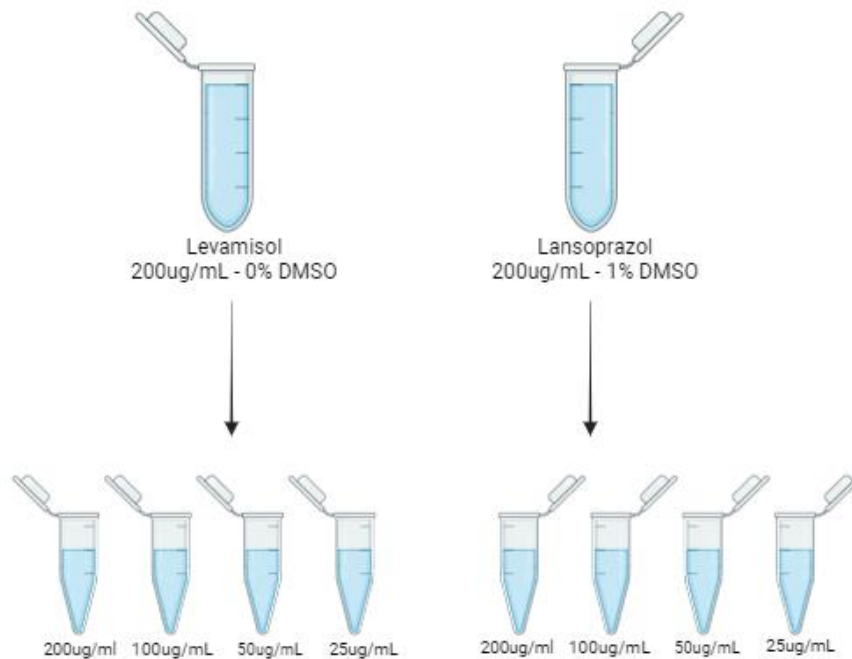
O ensaio de combinação foi realizado utilizando diferentes concentrações de ambos fármacos, de acordo com Almeida e colaboradores (2021). A viabilidade celular dos parasitos foi determinada por meio do ensaio de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium bromide) (Henriques et. al, 2011). As proporções de fármacos utilizadas em cada ensaio foram: 0:4; 1:3; 1:1; 3:1 e 4:0, sendo Levamisol:Lansoprazol. Cada fármaco foi previamente diluído em meio de cultivo (LIT) para obtenção das concentrações finais que serão combinadas e utilizadas no tratamento *in vitro* de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Foi utilizada uma densidade celular de 1×10^7 parasitos/mL para o período de incubação de 24 horas e 1×10^6 parasitos/mL para o período de incubação de 72 horas, em fase de crescimento exponencial, aplicada em placas de 96 poços. As diferentes concentrações da combinação dos fármacos foram adicionadas e as culturas foram mantidas a 28 °C durante 24h ou 72h. O controle negativo foi feito com os parasitos cultivados na ausência de fármacos. Todos os ensaios foram efetuados em triplicata com um poço extra destinado ao branco da combinação.

Cada poço da microplaca contém 20µL dos fármacos em combinação mais 90µL da cultura de parasitos. Exceto os poços destinados ao controle, branco do controle e branco da combinação, onde antes da aplicação do MTS, foi colocado 10µL de paraformaldeído.

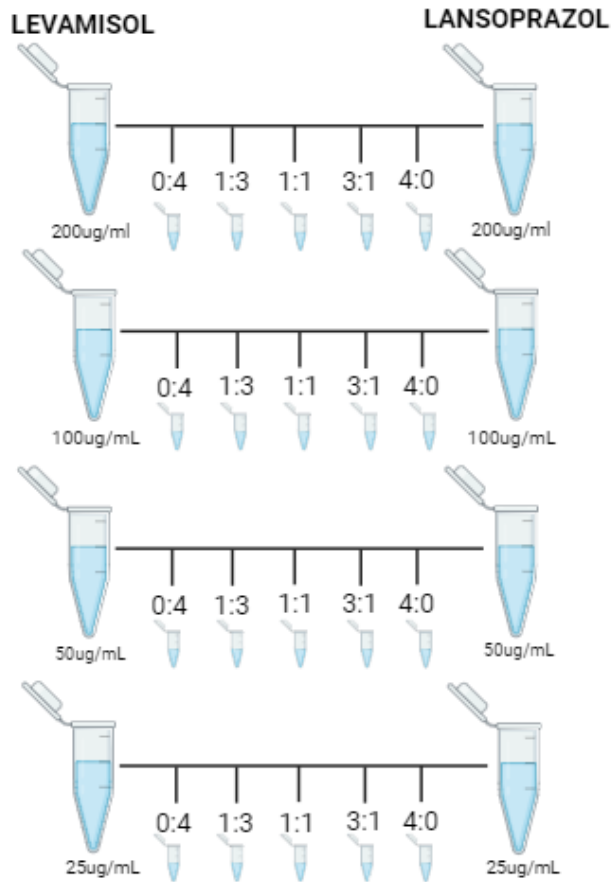
Esquema 1: Preparação dos parasitas em meio LIT e diluição inicial dos fármacos
 – Criado em BioRender.com



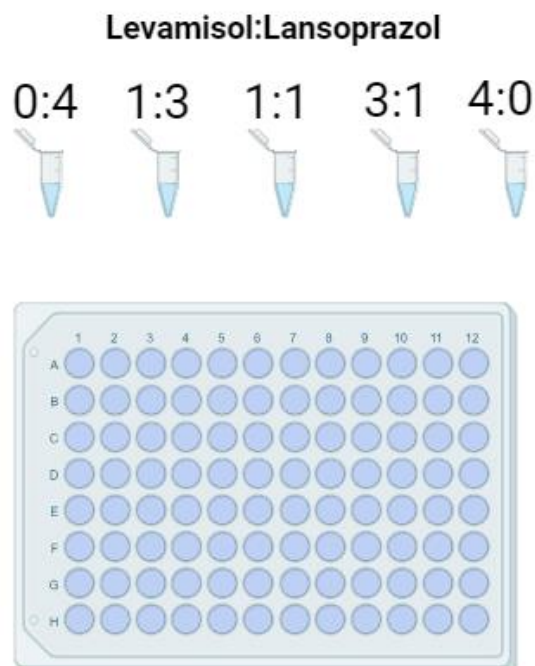
Esquema 2: Diluição para as concentrações úteis dos fármacos – Criado em BioRender.com



Esquema 3: Preparação das proporções em eppendorf e aplicação na microplaca – Criado em BioRender.com



Esquema 4: Aplicação em microplaca – Criado em BioRender.com



Determinação do índice de combinação (IC)

O índice de combinação foi calculado pela razão entre a concentração de um fármaco na combinação e em tratamento isolado. A partir dos valores obtidos de inibição foram calculadas as concentrações dos respectivos fármacos. Para tanto, cada valor de inibição foi multiplicado pelo número de partes correspondente a um dos compostos, em diferentes proporções, dividido pelo número total de partes da combinação. A média dos valores de inibição será realizada para cada combinação, com o intuito de fazer a classificação segundo Chou (2006), em: 0,1-0,3 (forte sinergismo); 0,3-0,7 (sinergismo); 0,7-0,85 (sinergismo moderado); 0,9-1,1 (quase aditivo).

Forma de análises dos resultados

A placa de 96 poços foi observada sob microscópio invertido após os períodos de incubação onde a observação foi direcionada à motilidade dos parasitos e presença de contaminação.

Após o período de incubação, para o auxílio da compreensão dos nossos resultados, a microplaca foi observada sob microscópio invertido e notadas as seguintes características: motilidade parasitária; presença de rosetas; presença de grumos de parasitos mortos; presença de contaminação bacteriana

O ensaio MTS foi feito após a observação no microscópio invertido, e após 4 horas de incubação do composto MTS, os valores de absorvância foram lidos em espectrofotometro, em leitora de Microplacas.

Os resultados foram tabulados em planilhas e a análise estatística realizada com auxílio dos softwares Excel e Graph Pad Prism 5.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises *in silico* realizadas anteriormente em nosso laboratório demonstraram que uma enzima ATPase transportadora de potássio poderia ser alvo homólogo do fármaco lansoprazol no *Trypanosoma cruzi* (TcCLB.506649.20). Esta ATPase cataliza a hidrólise do ATP em ADP, e é responsável pela bomba de prótons através das membranas que cria uma força motriz, utilizada por transportadores secundários para transportar íons e metabólitos para dentro e fora da célula (Avila, 2018).

Um estudo de Van Der Heyden e Do Campo, 2002, comprova que uma bomba de prótons desempenha um papel importante na regulação do potencial de membrana nos diferentes estágios do *Trypanosoma cruzi*. No estudo conduzido por estes autores,

foi comprovada a existência de uma bomba de sódio funcional sensível à presença de oubaína, uma substância orgânica inibidora específica da Na⁺ K⁺ ATPase, em tripomastigotas baseando-se na despolarização da membrana, entretanto, a oubaína não teve efeito nenhum sobre epimastigotas. Eles concluem enunciando que a presença de canais de potássio em amastigotas e uma bomba de sódio em tripomastigotas em adição com a H⁺-ATPase pode oferecer importantes novos alvos para o desenvolvimento de fármacos tripanocidas. Portanto, desde estudos anteriormente realizados no Laboratório de Imunologia, Biologia Molecular e Bioensaios da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, onde foi demonstrada a atividade antiparasitária sob formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* Dm28c do Lansoprazol, este fármaco se tornou um promissor alvo de estudo de reposicionamento direcionado à doença de Chagas.

O fármaco anti-helmíntico e imunomodulador Levamisol já é amplamente utilizado em estudos de potenciais novos fármacos para doenças parasitárias. As condições da modulação do sistema imune depende de algumas circunstâncias, como regime posológico, tempo de tratamento e estado imune do paciente, podendo assim o Levamisol ter resultados benéficos ou prejudiciais (Brunner & Muscoplat, 1980). Em estudo recente, Simões e colaboradores (2019) testaram a potencial atividade antiparasitária e imunomoduladora de Levamisol em modelo murinho de doença de Chagas. Foram testados protocolos do fármaco isoladamente e em associação com Benznidazol. Os autores concluíram que a combinação dos dois fármacos foi capaz de reduzir parcialmente a parasitemia e que o efeito modulador da resposta imune pôde ser atribuído à ação do Levamisol (Simões-Silva et al, 2019).

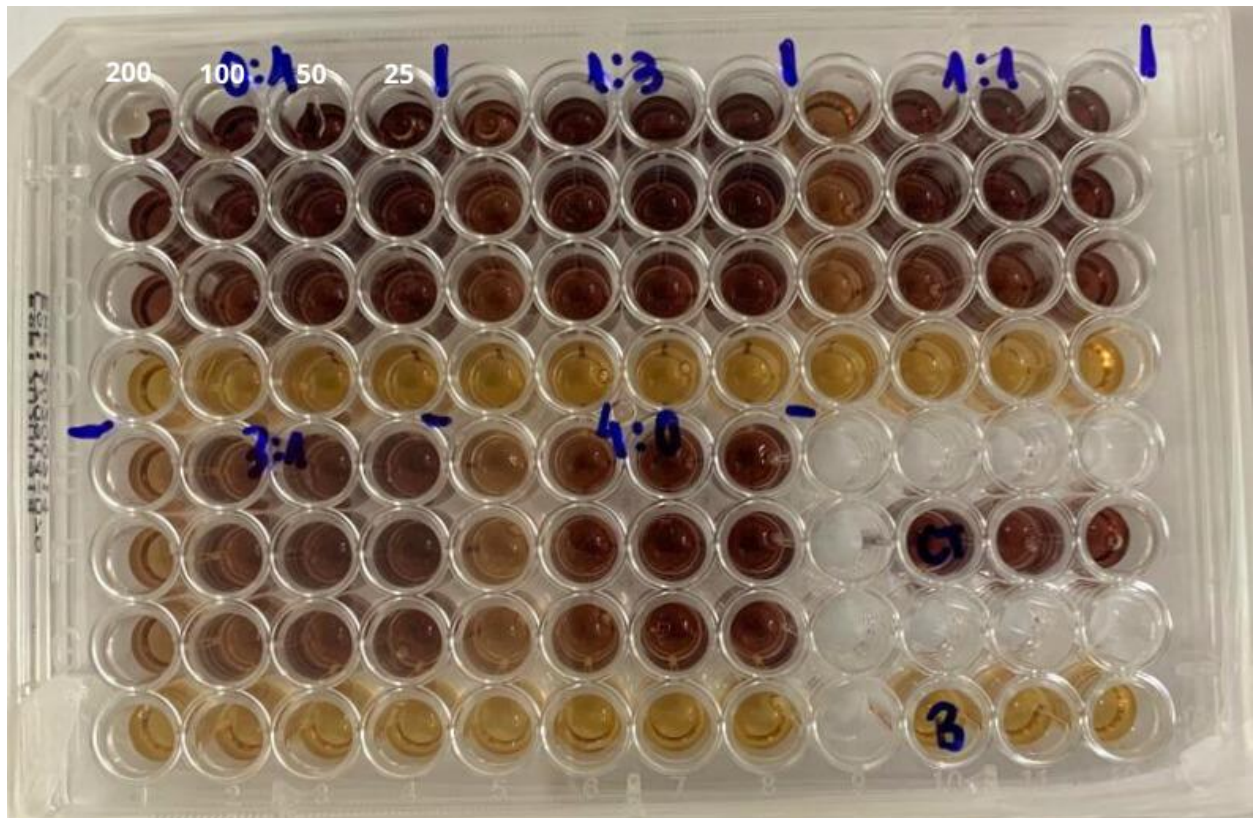
Este estudo conduz o ensaio de combinação entre estes dois fármacos *in vitro*, Lansoprazol e Levamisol. O protocolo seguido foi baseado nos seguintes passos: preparação dos parasitos; diluição dos fármacos; preparação das combinações; aplicação em microplaca; incubação; observações e posterior revelação com ensaio MTS.

Diversos ensaios foram realizados, sendo o primeiro com um período de incubação de 24 horas a 28°C, entretanto, pela ausência total de atividade, os testes posteriores foram todos realizados com um período de incubação de 72h a 28°C. A visualização em microscópio invertido foi incluída para confirmar por observação o que foi visto através das leituras de absorbância do ensaio MTS em ensaios anteriores. Em poços onde havia maior concentração (200µg/mL e 100µg/mL) e a parte do fármaco Levamisol era maior (como 3:1 e 4:0), havia mais grumos de parasitas mortos no fundo do poço, menor motilidade e menor quantidade de rosetas. Essas observações confirmaram o que foi posteriormente visto no ensaio MTS e no cálculo de concentrações

inibitórias.

Quando presente, a contaminação bacteriana podia ser vista a olho nu através de um precipitado no fundo dos poços. O meio de cultura LIT utilizado nos ensaios não conta com antibacteriano, por isso, a contaminação foi um problema em alguns testes realizados. Entretanto, os ensaios contaminados foram descartados, não houve prejuízo e pudemos obter resultados palpáveis com a repetição dos testes.

Figura 4: Esquema geral da microplaca após ensaio MTS, onde as proporções estão indicadas, e as concentrações em $\mu\text{g/mL}$ estão indicadas em branco no topo esquerdo da placa.



Os poços controle e estão indicados na placa pelas siglas CT e B, respectivamente, escritas em diretamente na placa.

A olho nu, é possível visualizar 3 proporções mais claras que as outras, sendo elas: 1:1 na concentração de $200\mu\text{g/mL}$; 3:1 na concentração de $200\mu\text{g/mL}$; e 4:0 na proporção de $200\mu\text{g/mL}$. Estas três proporções foram repetidas nas concentrações de $200\mu\text{g/mL}$ e $100\mu\text{g/mL}$ e a atividade observada foi confirmada.

Além do método MTS, a observação em microscópio invertido pode oferecer outros indicativos de que havia atividade antiparasitária presente. Entretanto, com o cálculo das concentrações inibitórias podemos ter um resultado mais palpável em relação à capacidade antiparasitária das combinações. Estas análises estatísticas foram

obtidas através das leituras de absorvância dos poços e submetidas ao software GraphPad Prism 5.

Tabela 1: IC₂₅; IC₅₀; IC₇₅; e IC₉₀ das três combinações de atividade antiparasitária positiva

	IC ₂₅ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	IC ₇₅ (µg/mL)	IC ₉₀ (µg/mL)
1:1	142,8	169,2	200,6	237,9
3:1	96,05	119,0	147,6	182,9
4:0	96,43	123,3	157,6	201,6

A tabela acima traz os valores de concentração inibitória relevantes para o estudo das combinações. Destaca-se a combinação **3:1** onde obtivemos os menores valores de concentrações inibitórias e nenhuma delas ultrapassa de 200 µg/mL.

Para que a classificação de sinergismo fosse calculada, era necessária a obtenção dos dados de IC₅₀ da combinação 0:4, sendo este o teste com o fármaco Lansoprazol isolado. Entretanto, os valores de viabilidade celular foram muito próximos e o cálculo da IC₅₀ não foi possível. Valores de viabilidade próximos maiores que 100% exprimem a ausência de atividade antiparasitária.

No geral, nossos dados indicam uma atividade relevante oferecida pelo Levamisol, uma vez que as melhores concentrações, indicadas pelo conjunto das concentrações inibitórias calculadas, têm parte igual ou maior do fármaco imunomodulador.

Este é um resultado parcial uma vez que necessita de comparação com o fármaco já utilizado para o tratamento da doença, e outros estudos que o complementem, como ensaios que verifiquem se este efeito promissor do Levamisol refere-se ao efeito do fármaco ou às alterações de osmolaridade da solução utilizada na reação.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se portanto que entre todas as proporções em 72h de incubação, os resultados são relevantes onde a IC₅₀ da proporção 3:1 (Levamisol:Lansoprazol) se mostrou melhor em relação às outras. Entretanto, outros ensaios ainda são necessários para verificar se este efeito promissor é de fato correspondente ao fármaco Levamisol.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMU, S., BISALLA, M., IBRAHIM, N. D., et al. Effect of immunomodulation with levamisole on the course and pathogenesis of acute experimental *Trypanosoma congolense* infection in sheep. *Afr J Biotechnol* 8, 2009.

AGÊNCIA FIOCRUZ de Notícias, Saúde e Ciência para todos. Doença de Chagas. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doença-de-chagas>. Acesso em: 25/05/2023

AMATO NETO, V. Terapêutica da forma crônica da doença de Chagas. Tratamento específico da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. *Arquivos Brasileiros De Cardiologia*, 70(1), 1998.

ANDREWS, K. T., FISHER, G., SKINNER-ADAMS, T. S. Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance*, v. 4, 2014.

ASHBURN, T. T., THOR, K. B. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. *Nature Reviews Drug Discovery*, v. 3, 2004.

AVILA, Carla Cristi et al. Proteome-wide analysis of *Trypanosoma cruzi* exponential and stationary growth phases reveals a subcellular compartment-specific regulation. *Genes*, v. 9, n. 8, p. 413, 2018.

BABA, T., WATASE, Y., YOSHINAGA, Y. Activation of mononuclear phagocyte function by levamisole immersion in carp. *Nippon Suisan Gakkaishi*, v. 59, 1993.

BARRADELL, L. B., FAULDS, D., MCTAVISH, D. Lansoprazole: A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and its therapeutic efficacy in acid-related disorders. *Drugs*, v. 44, n. 2, 1992.

BRUNNER, C. J.; MUSCOPLAT, C. C. Immunomodulatory effects of levamisole. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 176, n. 10 Spec No, p. 1159-1162, 1980.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 1964.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 1:159-218, 1909.

CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacological reviews*, v. 58.3, 2006.

COURA, J. R., VIÑAS, P. A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*, v. 24, 2010.

CRESPILLO-ANDÚJAR, Clara et al. Use of benznidazole to treat chronic Chagas disease: An updated systematic review with a meta-analysis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 16, n. 5, p. e0010386, 2022.

DE SOUZA, Cassiano Cunha et al. Silver and copper-benznidazole derivatives as potential antiparasitic metallodrugs: Synthesis, characterization, and biological evaluation. *Journal of Inorganic Biochemistry*, v. 239, p. 112047, 2023.

DE SOUZA, W. Doenças negligenciadas. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 2010.

DE ALMEIDA, J. M., NUNES, F. O., CEOLE, L. F., KLIMECK, T. D. M. F., DA CRUZ, L. A., TÓFOLI, D., & FERREIRA, A. M. T. Synergistic effect and ultrastructural changes in *Trypanosoma cruzi* caused by isoobtusilactone A in short exposure of time. *Plos one*, v. 16, n. 1, 2021.

DIAS, J. C. P. et al. II Consenso Brasileiro em doença de Chagas, 2015. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, v. 25, 2016.

DNDi, Drugs for Neglected Diseases Initiative Research and Development Portfolio 2020. New regimens and pediatric benznidazole. Disponível em: <https://dndi.org>. Acesso em: 25/05/2023

FALK, N. et al. Effectiveness of Nifurtimox in the treatment of Chagas disease: a long-term retrospective cohort study in children and adults. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 66, n. 5, p. e02021-21, 2022.

FERREIRA, Ariela Mota et al. Reações adversas ao benzonidazol no tratamento da Doença de Chagas: revisão sistemática de ensaios clínicos randomizados e controlados. *Cadernos Saúde Coletiva*, v. 27, p. 354-362, 2019.

FINDLAY, V. L., ZILBERG, D., MUNDAY, B. L. Evaluation of levamisole as a treatment for amoebic gill disease of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Journal of Fish Disease*, v. 23, 2000.

FIOCRUZ - Portal Da Doença De Chagas. Disponível em: <http://chagas.fiocruz.br>. Acesso em: 26/05/2023

GEETS, A., LIEWES, E. W., OLLEVIER, F. Efficacy of some antihelminthics against the swimbladder nematode *Anguillicola crassus* of eel *Anguilla anguilla* under saltwater conditions. *Disease of Aquatic Organism*, v. 13, 1992.

GULLO, C. E. et al.. Formas digestivas da doença de Chagas e carcinogênese: um estudo de associação. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 39, n. 2, p. 146–150, mar. 2012.

HENRIQUES, C. et al. Tetrazolium salt based methods for high-throughput evaluation of anti-parasite chemotherapy. *Analytical Methods*, v. 3, n. 9, 2011.

HOLCOMBE RF, MCLAREN CE, MILOVANOVIC T. Immunomodulation with low

dose levamisole in patients with colonic polyps. *Cancer Detect Prev*, 30: 94–98, 2006.

ITURRA, Jacqueline Araújo Domingos et al. A multicenter comparative study of the performance of four rapid immunochromatographic tests for the detection of anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies in Brazil. *Frontiers in Medicine*, v. 10, p. 1031455, 2023.

JOURDAN, Jean-Pierre et al. Drug repositioning: a brief overview. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 72, n. 9, p. 1145-1151, 2020.

KAJITA, Y., SAKAI, M., ATSUTA, S., KOBAYASH, M. The immunomodulatory effects of levamisole on rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish Pathology*, v. 25, 1990.

KUETE, V.; KARAOSMANOĞLU, O.; SIVAS, H. Chapter 10-Anticancer Activities of African Medicinal Spices and Vegetables (VBT-MS and V. from A. Kuete. 2017.

LIMA, Lídia M. Química medicinal moderna: desafios e contribuição brasileira. *Química Nova*, v. 30, p. 1456-1468, 2007.

MANUAL PARA DIAGNÓSTICO EM DOENÇA DE CHAGAS para microscopistas de base do estado do Pará / Juliana de Meus, Rejene Seila da Silva Castro. – Rio de Janeiro, 2017

MEYMANDI, Sheba et al. Treatment of Chagas disease in the United States. *Current treatment options in infectious diseases*, v. 10, p. 373-388, 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas. 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z-1/d/doenca-de-chagas>.

MUNDAY, B. L., ZILBERG, D. Efficacy of, and toxicity associated with, the use of levamisole in seawater to treat amoebic gill disease. *Bulletin of European Association of Fish Pathology*, v. 23, 2003.

O'CONNELL MJ, SARGENT DJ, WINDSCHITL HE et al. Randomized clinical trial of high-dose levamisole combined with 5-fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant therapy for high-risk colon cancer. *Clin. Colorectal Cancer*, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Chagas disease (American trypanosomiasis). In: Key Facts [Internet]. 2019.

RASSI JR, A., RASSI, A., MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. *The Lancet*, v. 375, 2010.

RASSI, A. Jr. Chagas disease. *Lancet*, v. 375, n. 9723, 2010.

SAYAD B, ALAVIAN SM, NAJAFI F et al. Effects of Oral Levamisole as an Adjuvant to Hepatitis B Vaccine in HIV/ AIDS Patients: A Randomized Controlled Trial. *Hepat Mon*, 12, 2012.

SCHMUNIS, G. A., YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, v. 115, 2009.

SILVA, Marianne Rocha Simões et al. Impact of levamisole in co-administration

with benznidazole on experimental Chagas disease. 2019.

SIMÕES-SILVA, M. R., PERES, R. B., BRITTO, C., CASCABULHO, C. M., OLIVEIRA, G. M., GAMA, A. N., SILVA, C. F., COSTA, K. L., ARAÚJO, P. F., CAMPOS, J. D. S., BATISTA, M. M., DEMARQUE, K. C., MOREIRA, O. C., SOEIRO, M. N. C. Impact of levamisole in co-administration with benznidazole on experimental Chagas disease. *Parasitology*, v. 146, n. 8, 2019.

SHIN, J. M., SACHS, G. Pharmacology of proton pump inhibitors. *Current Gastroenterology Reports*, v. 10, n. 6, 2008.

VAN DER HEYDEN, Nicole; DOCAMPO, Roberto. Proton and sodium pumps regulate the plasma membrane potential of different stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 120, n. 1, p. 127-139, 2002.

ZUMA, Aline A.; DOS SANTOS BARRIAS, Emile; DE SOUZA, Wanderley. Basic biology of *trypanosoma cruzi*. *Current Pharmaceutical Design*, v. 27, n. 14, p. 1671-1732, 2021.