

Atividade antiparasitária de *Streptomyces* spp. contra o *Trypanosoma cruzi*

Gonçalves, Franque Ferreira¹; Jarline, Ingride Santos da Silva²; Silva, Gilvan Ferreira da³; Lima, João Marcelo Silva¹; Procópio, Rudi Emerson de Lima¹

¹Universidade do Estado do Amazonas, ²Universidade Federal do Amazonas, ³Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Email: franquegoncalves@gmail.com

Resumo

Os medicamentos disponíveis para as tripanossomíases são poucos e apresentam toxicidade, e o surgimento de parasitas resistentes tem dificultado o tratamento, os *Streptomyces* tem sido nas últimas décadas uma fonte valiosa para desenvolver medicamentos eficazes contra várias doenças. Neste trabalho observamos que *Streptomyces* isolados dos Rios Madeira e Purus, foram capazes de inibir o crescimento de *Trypanosoma cruzi in vitro* e a análise foi realizada considerando-se a redução do desenvolvimento da infecção estabelecida, promovida pelo composto testado, em relação ao cultivo de células infectadas pelo parasito na ausência de extratos. Sendo que os isolados APUR 32.5; APUR 36.3; MPUR 40.3 e MPUR 36.1, foram os que apresentaram melhores resultados e podem ser selecionadas para avaliação da citotoxicidade das linhagens para utilização em futuros estudos. A tripanossomíases é considerada uma doença negligenciada, portanto, novos compostos contra o *T. cruzi* são importantes com melhores perfis de eficácia e segurança.

Palavras-Chave: Tripanossomíases; Doença de Chagas; Extratos naturais.

Introdução

O protozoário hemoflagelado parasita *Trypanosoma cruzi* é o patógeno responsável pela tripanossomíase americana, mais conhecida como doença de Chagas, uma doença com grande abrangência e com predomínio em regiões pobres, e como consequência disso se tornou uma das doenças tropicais negligenciadas, apesar de ocasionar um impacto socioeconômico alto. A doença foi descoberta há mais de um século, em 1909, pelo pesquisador e médico brasileiro Carlos Chagas (Salassa 2019).

Na doença de Chagas o ciclo de vida do *T. cruzi* inicia na forma tripomastigotas liberados nas fezes do inseto infectado e após a invasão é envolto por um vacúolo parasitóforo transitório, pois o parasita consegue escapar

e se multiplicar no citosol, diferenciando-se novamente na forma tripomastigota que será liberada na lise celular, podendo migrar dessa forma para as células vizinhas ou serem consumidas por outro inseto vetor (Moretti et al. 2019).

As principais formas de transmissão do protozoário incluem via vetorial, oral, congênita e transfusão sanguínea (Zingales 2017). A vetorial ocorre após a picada do inseto infectado ou contato direto com suas fezes na mucosa ocular. A transmissão oral se dá pelo consumo de alimentos como açaí e caldo-de-cana mal higienizados, contendo fezes de insetos infectados. A congênita acontece pela transferência do protozoário de mães infectadas para o feto, com risco agravado por parasitemia elevada, em mães HIV positivas. A transmissão por transfusão sanguínea, relatada em 1952, levou à triagem obrigatória dos hemocomponentes para infecção por *T. cruzi* (Bern 2011).

As actinobactérias são responsáveis por gerar um grande número de compostos metabólitos secundários, e essas substâncias bioativas são regularmente utilizadas na indústria farmacêutica (Al-Shaibani et al. 2021). O gênero *Streptomyces* é uma grande fornecedora para produtos bioativos, químicos e medicamentos há décadas principalmente de antibióticos (Procópio et al. 2012). Mas o seu potencial biológico pode ser muito maior e produzir aproximadamente milhares de novos compostos bioativos (Lacey et al. 2022). O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antiparasitária de *Streptomyces* isolados dos rios Madeira e Purus contra *Trypanosoma cruzi* *in vitro*.

Material e Métodos

Isolados e condições de cultivo

Neste trabalho foram utilizadas sete linhagens de actinomicetos (APUR 32.5, MAD 42, APUR 39.1, APUR 36.3, MPUR 21.2, MPUR 40.3, MPUR 36.1) isolados de sedimentos do Rio Madeira e Purus, pertencentes à coleção de microrganismos da Embrapa Amazônia Ocidental. Estas linhagens foram previamente identificadas por meio do sequenciamento da região 16S do rRNA como pertencentes ao gênero *Streptomyces*. As culturas estavam preservadas em glicerol 15% e mantidas a -80°C (Jose e Jha 2017). Para a preparação do pré-inóculo, os isolados foram cultivados em Erlenmeyer contendo 50 mL de meio de cultura ISP2 (4 g/L extrato de levedura; 10 g/L extrato de malte; 4g/L dextrose) (Shirling e Gottlieb 1966) por 7 dias sob agitação de 150

rpm a 280C. Após o crescimento, cada isolado foi centrifugado e o sobrenadante foi liofilizado e enviado para o laboratório de Genômica Funcional de Parasitos - GFP do Instituto René Rachou (IRR) - Fiocruz Minas. O extrato foi diluído em DMSO (20mg/mL) para os testes de inibição de *T. cruzi*.

Manutenção das células L929 e da cepa Tulahen do *T. cruzi*

Para a manutenção da cepa Tulahuen de *T. cruzi*, foi empregado um método conforme descrito por Romanha (2010), foi utilizado a cepa geneticamente modificada para expressar o gene da β -galactosidase. Essa transformação permitiu o monitoramento e a quantificação do crescimento parasitário. Células de camundongos (L929) cultivadas em meio RPMI 1640 e suplementado com SBF 10% e 2mM de glutamina foram semeadas em garrafas de 25 cm², 1,5x10⁵ células/garrafa. As células foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ durante 7 dias.

Ensaio de inibição de crescimento do *T. cruzi*

O ensaio *in vitro* com as formas amastigotas intracelulares e tripomastigotas do *T. cruzi* foi realizado de acordo com Buckner et al. (1996). O meio de cultura foi trocado por 180 μ L de RPMI e 20 μ L do composto a ser testado em triplicata, para as diferentes concentrações (3,12; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 μ g/mL), e incubado em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 96 horas, os resultados foram expresso como inibição do crescimento de acordo Oliveira et al. (2006) e a análise foi realizada considerando-se a redução do desenvolvimento da infecção estabelecida, promovida pelo composto testado, em relação ao cultivo de células infectadas pelo parasito na ausência de extratos. Os testes antitripanossoma foram realizados em triplicatas no instituto René Rachou / FIOCRUZ em Belo Horizonte MG.

Resultados e Discussão

Dos sete *Streptomyces* testados, quatro apresentaram atividade contra o *T. cruzi* (APUR 32.5; APUR 36.3; MPUR 40.3 e MPUR 36.1), como pode ser observado na Tabela 1. Os *Streptomyces* APUR 32.5, MAD 42 e MPUR 21.2 não apresentaram atividade antiparasitária em nenhuma das concentrações testadas. O ensaio *in vitro* foi realizado com formas amastigotas intracelulares e

tripomastigotas do *T. cruzi*. A ação dos compostos sobre as formas intracelulares foi avaliada considerando a redução do desenvolvimento da infecção, em relação ao cultivo de células infectadas pelo parasito na ausência de extratos. Os resultados na Tabela 1 referem-se à atividade antiparasitária dos *Streptomyces* testados contra ambas as formas evolutivas do parasito, amastigotas intracelulares e tripomastigotas.

Tabela 1. Atividade antiparasitária dos *Streptomyces* nas diferentes concentrações testadas.

Streptomyces isolados	Concentração (µg/mL)	Atividade¹ (%)	IC₅₀ sobre o parasita² (µg/mL)	CC₅₀ sobre L929³ (µg/mL)	
APUR 32.5	100* 50* 25 12,5 6,25 3,12	100 100 100 100 100 100	< 3,12	Análise ao microscópio indica altotoxicidade	Indicado para ensaio de citotoxicidade
APUR 36.3	100* 50* 25* 12,5 6,25 3,12	100 100 100 100 97,5 53,9	< 3,12	Análise ao microscópio indica alta toxicidade	Indicado para ensaio de citotoxicidade
MPUR 40.3	100* 50* 25* 12,5* 6,25* 3,12*	96,2 80,3 47,6 27,8 7,4 9,4	26,83	-	-
MPUR 36.1	100* 50 25 12,5 6,25 3,12	100 99,9 48,7 53,4 41 14,5	10,79	-	Indicado para ensaio de citotoxicidade
Benzonidazol	3,81 µM (1 µg/mL)	-	3,81 µM (1 µg/mL)	2.381 µM (625 µg/mL)	-

¹Porcentagem de redução das formas amastigotas e tripomastigotas sob ação do composto. ²Concentração do composto que reduz em 50% o crescimento parasitário. ³Concentração do composto que induz 50% de morte celular. ⁴IC₅₀ do composto sobre as células dividido pelo IC₅₀ do composto sobre o parasito. Os valores de IC₅₀ foram calculados através de interpolação linear. * ~ 100% de morte das células hospedeiras L929. ~ 50% de morte das células hospedeiras L929.

O isolado MPUR 40.3 apresentou atividade antiparasitária com IC₅₀ a partir da concentração 26,83 µg/mL. O isolado APUR 39.1 apresentou excelente efetividade antiparasitária em todas as concentrações, com redução de 100% da atividade parasitária contra ambas as formas evolutivas do parasito (amastigotas intracelulares e tripomastigotas) a partir da concentração mínima testada de 3,12 µg/mL. Na análise ao microscópio, indicou alta toxicidade ou efetividade frente às células infectadas por *T. cruzi*. O isolado foi altamente tóxico para as células de camundongos, sendo recomendada a realização de ensaio para

avaliar citotoxicidade. O isolado APUR 36.3 apresentou alta efetividade antiparasitária com IC50 a partir da concentração mínima testada 3,12 µg/mL e redução de 100% a partir da concentração 12,5 µg/mL. Na análise ao microscópio, indicou alta toxicidade, sendo recomendada a realização de ensaio para avaliar citotoxicidade. O isolado MPUR 36.1 apresentou IC50 a partir da concentração 10,79 µg/mL e redução de 100% na concentração máxima testada de 100 µg/mL.

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar que os *Streptomyces* testados apresentaram diferentes resultados, desde a ausência de atividade contra *T. cruzi* (APUR 32.5, MAD 42 e MPUR 21.2), até 100% de inibição na menor concentração testada (APUR 32.5). Rolón et al. 2006 também demonstrou que compostos derivados de *Streptomyces* possuem a capacidade de inibir in vitro o crescimento do *T. cruzi*. Além de Rolón et al. 2006, outros autores, como Lima et al. (2012) e Ferreira et al. (2019), também demonstraram a atividade antiparasitária de compostos derivados de *Streptomyces* contra *T. cruzi*. Quanto à utilização de cepas não geneticamente modificadas, Andrade et al. (2014) trabalharam com cepas de *T. cruzi* não modificadas geneticamente e também observaram atividades antiparasitárias de compostos isolados de *Streptomyces*.

A utilização do gênero *Streptomyces* nas pesquisas por bioativos é amplamente conhecida, pela sua característica de produção de metabólitos secundários diferentes. Dependendo da localização do habitat do *Streptomyces*, ainda é uma área com grande potencial para novas substâncias com atividade farmacológica.

Conclusões

Foi possível observar que os extratos aquosos dos *Streptomyces* testados contra *T. cruzi in vitro*, apresentaram diferentes porcentagem de inibição (de 0 a 100%). Além disso, os compostos mais promissores deverão ser isolados e identificados para aprofundar o conhecimento sobre sua atividade antiparasitária, e avaliar a citotoxicidade destes compostos de *Streptomyces*, para uma possível atividade terapêutica.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisas do Estado do Amazonas - FAPEAM e ao Instituto René Rachou - FIOCRUZ.

Referências

Al-Shaibani, M.M.; Radin Mohamed, R.M.S.; Sidik, N.M.; Enshasy, H.A.E.; Al-Gheethi, A.; Noman, E.; et al. 2021. Biodiversity of Secondary Metabolites Compounds Isolated from Phylum Actinobacteria and its therapeutic Applications. *Molecules* 26(15): 4504.

Andrade, C.M.; Silva, L.M.A.; Santos, R.F.A.; Mota, C.M.G.; Bernardo, L.R.; Costa, M. D. B.; et al. 2014. Screening of *Streptomyces* spp. for antitrypanosomal activity: a study on strains collected from Brazilian soil. *Biological Research* 47(1): 1-8.

Bern, C.; Kjos, S.; Yabsley, M.J.; Montgomery, S.P. 2011. *Trypanosoma cruzi* and Chagas' Disease in the United States. *Clinical Microbiology Reviews* 24(4): 655-681.

Buckner, F.S.; Verlinde, C.L.M.J.; La Flamme, A.C.; Van Voorkhis, W.C. 1996. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -Galactosidase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40: 2592-2597.

Ferreira, L.M.; Teixeira, T.A.; Bezerra, J.W.A.A.; Da Silva, M.C.; Da Silva, L.M.A.; Santos, R.F.A.; Costa, M. D. B. 2019. *Streptomyces* sp. CBMAI 2042 as a source of antitrypanosomal compounds. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 29(5): 562-567.

Kuester, E.; Williams, S. T. 1964. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. *Nature* 202(4928): 928-929.

Lacey, H.J.; Rutledge, P.J. 2022. Recently Discovered Secondary Metabolites from *Streptomyces* Species. *Molecules* 27(3): 887.

Lima, L.M.; Bernardo, L.R.; Dantas, L.F.; Battistuzzi, F.G.; Ferraz, A.O.; Mota, C.M.G.; et al. 2012. In vitro antitrypanosomal activity of methylated flavonoids from *Calyptrocalyx spicatus* (Arecaceae). *Parasitology Research* 111(1): 59-65.

Moretti, N.S.; Mortara, R.A.; Schenkman, S. 2020. *Trypanosoma cruzi*. *Trends in Parasitology* 36(4): 404-405.

Oliveira, A.R.B.; Vaz, A.B.M.; Alves, R.O.; Liarte, D.B.; Donnici, C.L.; Romanha, A. J.; Zani, C.L. 2006. Arylfurans as potential *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase inhibitors. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 101: 169-173.

Procópio, R.E.L.; Silva, I.R.; Martins, M.K.; Azevedo, J.L.; Araújo, J.M. 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 16: 466-471.

Rolón, M.; Velázquez, E.; Fuentealba, C.; Muñoz, S.; Pereira, I.; Vera, L.; et al. 2006. Antimicrobial and trypanocidal activities of *Streptomyces* spp. isolated from *Araucaria araucana* rhizosphere. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22(5): 433-438.