

2.13.99 - Parasitologia.

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-LEISHMANIA DE UM COMPOSTO SINTÉTICO DA CLASSE DA N-ACILHIDRAZONA *IN VITRO*.

Dahara K. C. Silva^{1,2*}, Tatiana B. dos Santos^{1,2}, Cássio S. Meira³, Tiago F. Silva⁴, Diogo R. M. Moreira⁵, Eliezer J. Barreiro⁶, Milena B. P. Soares⁷, Elisalva T. Guimarães⁸

1. Estudante de IC do Departamento de Ciências da Vida, UNEB

2. Estudante de IC do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA

3. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Medicina Investigativa e Biotecnologia do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA

4. Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ

5. Pesquisador em Saúde Pública do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA

6. Pesquisador Coordenador do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativas (LASSBio), UFRJ, Rio de Janeiro

7. Pesquisadora Chefe do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA e do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC) do Hospital São Rafael.

8. Professora e Pesquisadora do Departamento de Ciências da Vida, UNEB e do Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ-BA/ Orientadora

Resumo:

A leishmaniose é um problema de saúde pública no Brasil e o seu tratamento possui limitações. Logo, a busca de novos fármacos torna-se relevante. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade anti-leishmania do composto sintético da classe da N-acilhidrazona contra formas promastigotas e amastigotas *in vitro*. Inicialmente, realizou-se a padronização da cultura de *Leishmania amazonensis*. A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos. Em seguida, foi avaliado o efeito do composto sob as formas promastigotas do parasito através de contagem em câmara de Neubauer e pelo ensaio de viabilidade celular com AlamarBlue. O efeito do LASSBio-1386 também foi avaliado na infecção de macrófagos por *L. amazonensis*. O LASSBio-1386 apresentou baixa citotoxicidade e inibiu formas promastigotas em cultura axênica. Além disso, o LASSBio-1386 reduziu o número de células infectadas e o número de amastigotas por macrófago. Esses dados demonstram um perfil anti-leishmania deste composto.

Autorização legal: Protocolo de procedimento CEUA 016/2013 aprovado e licenciado pela Comissão de Ética no uso de Animais pelo IGM.

Palavras-chave: *Leishmania*; tratamento; LASSBio-1386.

Apoio financeiro: CNPq, Fapesb, IGM, UNEB.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UNEB

Introdução:

A leishmaniose é uma doença infecciosa que representa um sério problema de saúde pública em vários países subtropicais e tropicais, incluindo o Brasil. São relatados mais de 700.000 novos casos pela OMS todos os anos. Esta doença é causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania* e, dependendo da espécie e da resposta imune do hospedeiro, apresenta diferentes formas clínicas e em diversos níveis de gravidade. Na América do Sul, por exemplo, a *Leishmania amazonensis* pode causar a leishmaniose cutânea, que apresenta aspecto de cronicidade, latência e desenvolvimento de metástases que conduzem a quadros clínicos desfigurantes (CARVALHO et al., 1985; SACKS E NOBEN-TRAUTH, 2002; ALVAR et al., 2012; HURDAYAL E BROMBACHER, 2014; WHO, 2017). O tratamento de primeira linha da leishmaniose consiste na utilização de antimoniais e outros quimioterápicos como a anfotericina B. Estes fármacos possuem diversas limitações, principalmente relacionadas à toxicidade. Logo, o desenvolvimento de novos fármacos que sejam eficazes contra os parasitos e menos tóxicos para os pacientes torna-se relevante (WHO, 2010; RATH et al., 2003). As hidrazonas são uma classe de compostos orgânicos sintéticos cujo grupo funcional apresenta em sua estrutura dois átomos de nitrogênio e um carbono. Alguns dos seus derivados já apresentam descrições na literatura por suas atividades antimicrobiana e antifúngica (APOTROSOAEI et al., 2013), anti-inflamatória e analgésica (ALAM et al., 2012; HAMDY et al., 2013). Não há descrição na literatura sobre a atividade leishmanicida deste composto. Dessa forma, o objetivo geral deste trabalho foi investigar a atividade anti-leishmania do composto sintético da classe da N-acilhidrazona contra promastigotas e amastigotas intracelulares *in vitro*.

Metodologia:

Inicialmente, foi realizada a curva de crescimento e padronização da cultura de *Leishmania amazonensis*. Para

este fim, formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR88/BA-125 Leila strain) foram cultivadas em meio Liver Infusion Triptose (LIT) ou Schneider (Sigma-Aldrich) contendo 10% de soro bovino fetal (FBS, Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 50 µg/mL de gentamicina (Life, Carlsbad, CA) e incubados a 26°C. Os parasitos foram contados diariamente em câmara de Neubauer, durante cinco dias. Ao atingirem a fase estacionária de crescimento, novas passagens *in vitro* foram realizadas. Para a avaliação da citotoxicidade foram utilizados macrófagos da linhagem J774, incubados em placas de 96 poços (1x10⁴ células/poço) em meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro bovino fetal e 50 µg/mL de gentamicina e mantidos por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após 72 h, foi adicionado 20 µL/poço de AlamarBlue durante 6 h. A leitura no espectrofotômetro foi realizada a 570 e 600 nm. Os valores de CC₅₀ foram calculados utilizando Graph Pad Prism version 5.01 (Graph Pad Software, San Diego, CA). Em concentrações atóxicas (20, 10 e 5 µg/mL), foi avaliado o efeito do composto sobre as formas promastigotas do parasito através de contagem em câmara de Neubauer. Promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados em placas de 96 poços (1x10⁵ por poço) em meio LIT completo e submetidas ao tratamento. Durante cinco dias foi feita a contagem em câmara de Neubauer. Além disso, também foi realizado o ensaio de viabilidade celular das formas promastigotas com AlamarBlue. Promastigotas de *L. amazonensis* (1x10⁶ por poço) foram cultivadas em placa de 96 poços em meio Schneider (Sigma-Aldrich) completo e submetidas ao tratamento com concentrações atóxicas (20, 10, 5, 2,5 e 1,25 µg/mL) da *N*-acilhidrazona. Após 72 h, foi adicionado 20 µL/poço de AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA) durante 2 horas. A leitura no espectrofotômetro foi realizada a 570 e 600 nm. Os valores de CI₅₀ foram calculados utilizando Graph Pad Prism version 5.01 (Graph Pad Software, San Diego, CA). O índice de seletividade foi calculado pela razão entre a Concentração Citotóxica 50% (CC₅₀) para células J774 e IC₅₀ para parasito. Em seguida, avaliou-se o efeito do LASSBio-1386 na infecção de macrófagos por *L. amazonensis in vitro*, através da coloração em GIEMSA e da contagem do número de células infectadas e do número de amastigotas por célula em microscópio óptico. Para isso, macrófagos J774 foram cultivados em placas de 24 poços (5x10⁵ /poço) e infectados com *L. amazonensis*, na razão de 10 parasitos por macrófago. Os compostos foram adicionados aos poços. A anfotericina B foi utilizada como controle positivo na mesma concentração (20, 10 e 5 µg/mL). Após 24 h, as células foram fixadas em metanol e coradas por GIEMSA (Sigma-Aldrich). A porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos foram determinados pela contagem de 100 células em campos aleatórios.

Resultados e Discussão:

O composto LASSBio-1386 apresentou baixa citotoxicidade, quando comparado com a violeta genciana, com valores de CC₅₀ superiores a 100 µg/mL. Além disso, o tratamento com o composto foi capaz de inibir a proliferação das formas promastigotas do parasito nas concentrações testadas. Atráves do índice de seletividade, percebeu-se que o LASSBio-1386 foi uma molécula seletiva para a leishmania. O composto também foi capaz de reduzir a porcentagem de células infectadas e no número de amastigotas por macrófagos, após 24 horas de tratamento.

Conclusões:

Os resultados obtidos demonstram que o LASSBio-1386 apresenta um perfil anti-leishmania, tanto sob formas promastigotas como em formas amastigotas.

Referências bibliográficas

- ALAM, Mohammad Mumtaz et al. ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF 4, 5-DIHYDROPYRIMIDINE-5-CARBONITRILE DERIVATIVES: THEIR SYNTHESIS AND SPECTRAL ELUCIDATION. *Acta poloniae pharmaceutica*, v. 69, n. 6, p. 1077-1085, 2012.
- ALVAR, Jorge et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.
- APOTROSOAEI, M.; VASINCU, I.; LUPASCU, F.; CONSTANTIN, S.; LUPASCU, D.; PROFIRE, L. New hydrazones with pyrazolone structure: synthesis, characterization and biological evaluation. *Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iasi.*, Apr-Jun, 117(2): 538-44, 2013.
- CARVALHO, E. M. et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *The Journal of Immunology*, v. 135, n. 6, p. 4144-4148, 1985
- HAMDY, N. A.; ABDEL- AZIZ, H. A.; KAMEL, G. M.; FAKHR, I. M. Convenient synthesis, antiinflammatory, analgesic and ulcerogenic activities of some new bis-hydrazones and pyrazole derivatives. *Acta Pol Pharm.*, May-Jun, 70(3): 469-80, 2013.
- HURDAYAL, Ramona; BROMBACHER, Frank. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. *Immunology letters*, v. 161, n. 2, p. 179-183, 2014.
- RATH, Susanne et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, 2003.

SACKS, David; NOBEN-TRAUTH, Nancy. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845, 2002.

World Health Organization. Control of the leishmaniases. World Health Organization technical report series. World Health Organization, Geneva, Switzerland. 2010

World Health Organization. Leishmaniasis. Fact Sheet. 2017