

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO COMPOSTO SINTÉTICO (E)-2-([2,2'-BITIOFEN]-5-IL-METILENO)HIDRAZINOCARBOTIOAMIDA EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

Andressa F. Dacome^{1*}, Helito Volpato², Celso V. Nakamura³, Sueli de O. S. Lautenschlager⁴

1. Estudante de IC do curso de Farmácia da Universidade Estadual Maringá (UEM)
2. Pesquisador do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos da UEM
3. UEM/ Departamento de Ciências Básicas da Saúde/ Co-orientador
4. UEM/ Departamento de Ciências Básicas da Saúde/ Orientadora

Resumo:

No Brasil a terapia da leishmaniose é baseada em medicamentos que promovem altos índices de toxicidade ao paciente. O presente estudo avaliou a atividade do composto sintético (E)-2-([2,2'-bitiofen]-5il-metileno)hidrazinocarbotioamida (**B-TIOSSIEMI**), contra as formas promastigotas e amastigotas da *L. amazonensis* e sua citotoxicidade frente as células de mamíferos. Avaliamos também um possível mecanismo de ação deste composto em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Nossos resultados mostraram que o composto **B-TIOSSIEMI** é efetivo contra as formas promastigota e amastigota de *L. amazonenses*. A microscopia eletrônica, constatou alterações ultraestruturais que comprometem a viabilidade das formas promastigotas. Observamos ainda um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO), aumento de inclusões lipídicas e alterações na integridade de membrana plasmática em formas promastigotas tratadas. Essas alterações podem estar relacionadas com o desequilíbrio redox da célula. Estes resultados, mostram que o composto **B-TIOSSEMI** pode ser uma alternativa para o tratamento de pacientes com leishmaniose.

Palavras-chave: leishmaniose; promastigotas; amastigota.

Apoio financeiro: PIBIC/CNPq-FA-UEM.

Trabalho selecionado para a JNIC pela instituição: UEM.

Introdução:

A leishmaniose é uma doença negligenciada causada por protozoários do gênero *Leishmania* (LISBOA et al., 2016), transmitida através dos flebotomíneos do gênero *Lutzomia* e *Phlebotomus* (DE CARVALHO & MORENO, 2001; MURRAY et al., 2005).

Estima-se que haja aproximadamente 1,3 milhões de novos casos ao ano, totalizando cerca de 12 milhões de pessoas infectadas no mundo (WHO, 2015).

O tratamento da leishmaniose é feito a partir dos antimoniais pentavalentes (RATH, 2003), anfotericina B, pentamidinas (BRASIL, 2010) e mitelfosina. Infelizmente, os atuais fármacos apresentam alto índice de toxicidade e alguns casos de resistência (BERMAN, 1997). Em vista disso, estudos com substâncias naturais e sintéticas têm sido considerado uma importante via no desenvolvimento de novos fármacos.

Estudos recentes realizados por Takahashi demonstraram atividade promissora de compostos isolados de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass, podendo estar relacionada com a presença do grupo tiofeno em suas estruturas químicas (TAKAHASHI et al., 2011; TAKAHASHI; BRITTA, 2013). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade biológica e mecanismo de ação do composto derivado tiofênico sintético (E)-2-([2,2'-bitiofen]-5il-metileno)hidrazinocarbotioamida (**B-TIOSSEMI**) frente formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Metodologia:

O composto (E)-2-([2,2'-bitiofen]-5il-metileno)hidrazinocarbotioamida (**B-TIOSSEMI**) foi sintetizado pelo grupo de pesquisa da prof^a Dr^a Maria Helena Sarragiotto do departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (Maringá, Paraná - Brasil) e enviado para o Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos para avaliação de sua atividade leishmanicida. Para analisar sua atividade biológica, formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 parasitos/mL) foram tratadas com diferentes concentrações do **B-TIOSSEMI** (0,5 μ M; 1 μ M; 5 μ M; 10 μ M e 50 μ M) por 72 h. Após o tratamento, foi realizada a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer para determinação da concentração inibitória de 50% dos parasitos (CI₅₀). Para avaliar a citotoxicidade, macrófagos da linhagem J774A1 (5×10^5 células/mL) foram tratados com diferentes concentrações do **B-TIOSSEMI** (25 μ M; 12,5 μ M; 6,25 μ M; 3,1 μ M; 1,5 μ M e 0,7 μ M) durante 48 h. Em seguida, as células foram incubadas em MTT por 4 h, adicionado DMSO e realizado leitura em espectrofotômetro de placa (470 nm) com objetivo de determinar a concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀). Para avaliar a atividade em formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, macrófagos J774A1 (5×10^5 células/mL) foram aderidos em lâminulas de vidro por um período de 24 h. Posteriormente incubou-se a placa por mais 24 h na presença de formas promastigotas do parasito (5×10^6 parasitos/mL). Após a interação, as células foram tratadas com diferentes concentrações do composto B-TIOSSEMI (25 μ M; 12,5 μ M; 6,25 μ M; 3,1 μ M; 1,5 μ M e

0,7 μM) e incubadas por 48 h. Em seguida, as células foram fixadas com metanol e coradas com solução de Giemsa (10%). A contagem de 200 células foi realizada em microscópio óptico comum a fim de determinar a concentração do composto que inibe 50% dos protozoários (IC₅₀).

Com intuito de elucidar o possível mecanismo de ação do composto em formas promastigotas, foram realizadas metodologias para análise de alterações ultraestruturais e bioquímicas. Para determinar alterações ultraestruturais, formas promastigotas (1×10^6 parasitos/mL) foram tratadas com **B-TIOSSEMI** (5 μM ; 10 μM e 20 μM) por 24 h, e em seguida processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Após o tratamento os parasitos foram lavados com PBS, fixados com glutaraldeído 2,5%, lavados em tampão cacodilato 0,1 M, pós-fixado com tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8%, desidratados em acetona, incluídas em resina EPON, realizado corte ultrafinos, contrastado com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo, e visualizado em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JM 1400. A fim de observar alterações bioquímicas no parasito, foram realizadas metodologias por espectrofluorescência. Para isso, formas promastigotas (1×10^6 parasitos/mL) foram tratadas com **B-TIOSSEMI** (5 μM ; 10 μM e 20 μM) por 24 h, e em seguida os parasitos foram lavados com PBS e marcados com iodeto de propídio, H₂DCFDA e Vermelho do Nilo para avaliar a integridade da membrana plasmática, níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e inclusões lipídicas, respectivamente.

Resultados e Discussão:

O composto sintético **B-TIOSSEMI** demonstrou atividade promissora frente a promastigotas de *L. amazonensis*, apresentando um CI₅₀ de 5 $\mu\text{M} \pm 0,272$. Com relação a sua citotoxicidade em macrófagos J774A1, verificamos que o composto teve um CC₅₀ de 365 $\mu\text{M} \pm 7,64$, demonstrando um índice de seletividade (IS:73). Quanto a sua atividade frente as formas amastigotas do parasito, o composto apresentou um CC₅₀ de 2,3 $\mu\text{M} \pm 1,59$. Desse modo os resultados obtidos (**Figura 1, 2 e 3**) foram satisfatórios, visto que a droga não apresenta toxicidade elevada às células dos mamíferos nas mesmas proporções quando comparadas ao parasito.

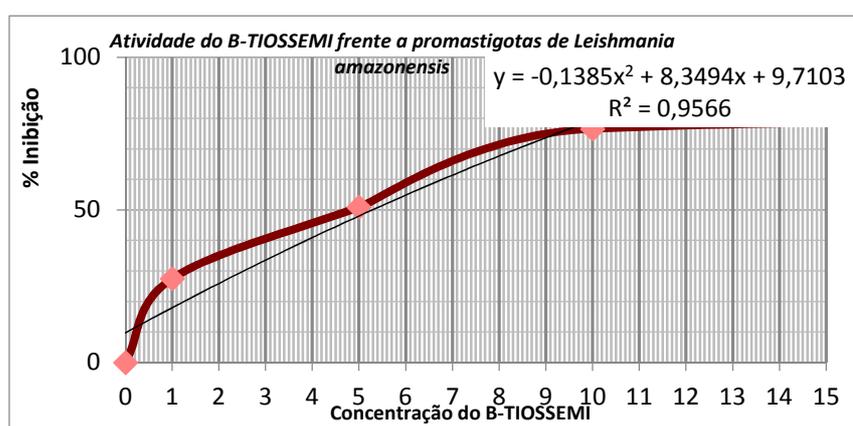


Figura 1. Atividade do **B-TIOSSEMI** contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* após 72 h de tratamento.

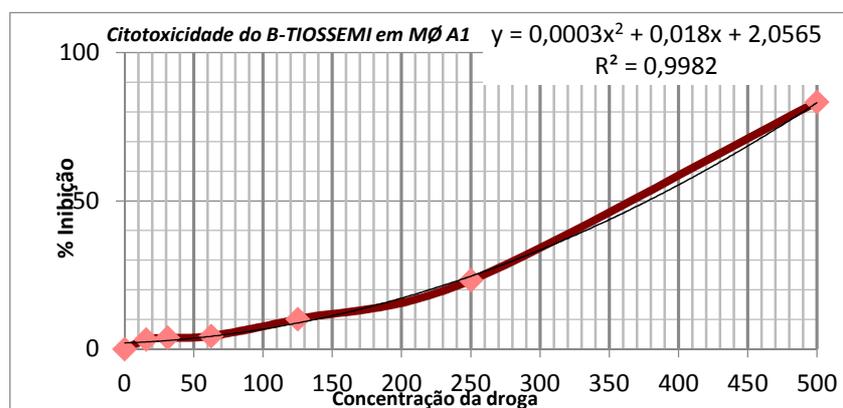


Figura 2. Determinação da concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) em Macrófagos J774A1 a partir do composto **B-TIOSSEMI**.

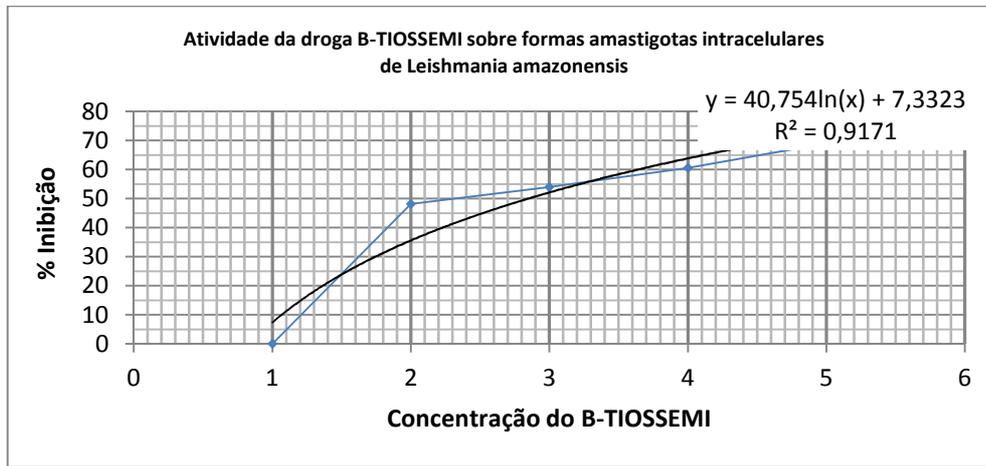


Figura 3. Avaliação da atividade do **B-TIOSSEMI** em formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*

As alterações morfológicas foram observadas em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o C150 do **B-TIOSSEMI** (**Figura 4**). Foi possível evidenciar alterações durante a divisão binária do parasito, o que propõe que o fármaco atue durante seu processo de divisão

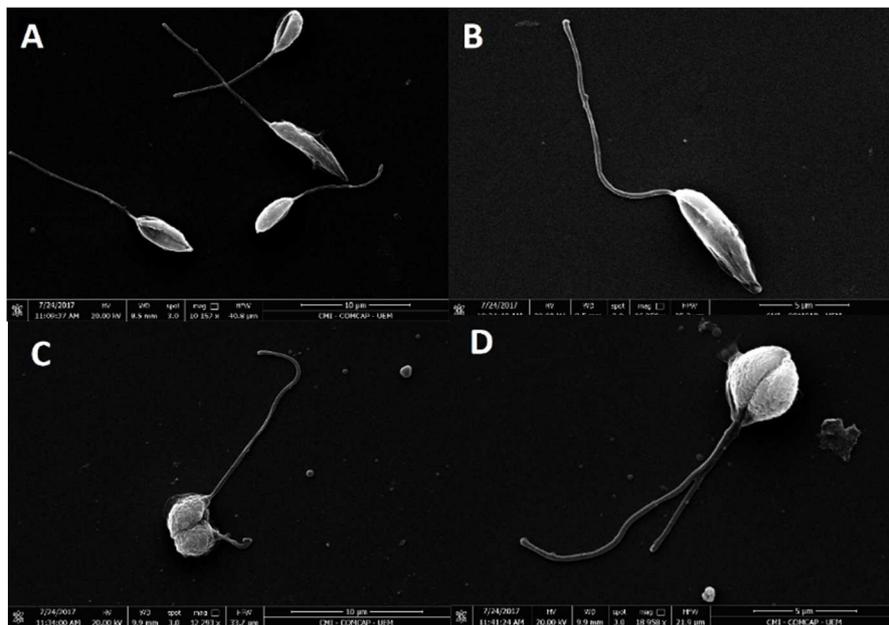


Figura 4. (A-D) Análise estrutural feita por microscopia eletrônica de varredura em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **B-TIOSSEMI**: (A-B) controle não tratado e (C-D) tratado com 5µM.

Através de microscopia eletrônica de transmissão encontrou-se alterações ultraestruturais nos parasitos tratados com o composto (**Figura 5**), como por exemplo, alteração no cinetoplasto, presença de estruturas concêntricas de membrana, presença de vacúolos e inclusões lipídicas. Por meio de metodologias fluorimétricas foi possível verificar que o composto **B-TIOSSEMI** induziu aumento dos níveis de ERO, aumento de inclusões lipídicas e alterações na integridade de membrana plasmática em formas promastigotas tratadas por 24 h (**Figura 5**).

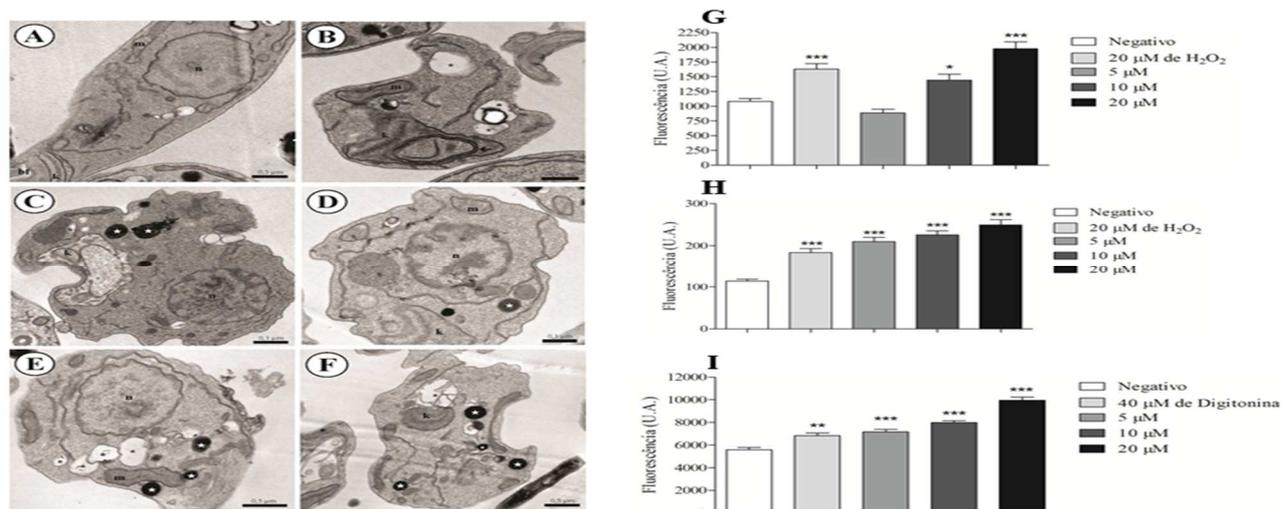


Figura 05. (A-F). Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas tratadas com **B-TIOSSEMI**: **(A)** controle não tratado, **(B-D)** tratado com 5 μM e **(E-F)** tratado com 10 μM. **(G)** Níveis de espécies reativas de oxigênio, **(H)** Níveis de inclusões lipídicas e **(I)** Avaliação da integridade de membrana plasmática por espectrofluorímetro. **(n)** núcleo, **(m)** mitocôndria, **(k)** cinetoplasto, **(g)** complexo de Golgi, **(bf)** bolsa flagelar, asteriscos: vacúolos, e estrela branca: inclusões lipídicas.

O estresse oxidativo é caracterizado por uma alteração no metabolismo redox, podendo estar relacionado com o aumento dos níveis de ERO e/ou diminuição do sistema antioxidante da célula. Desta forma, as ERO podem provocar danos celulares que culmina na morte celular, como por exemplo, alteração em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. No presente trabalho, foi possível verificar que o composto **B-TIOSSEMI** provocou alteração na integridade da membrana plasmática, inchaço mitocondrial e aumento de inclusões lipídicas, podendo ser explicado pelo aumento dos níveis de ERO.

Conclusões:

O composto **B-TIOSSEMI**, apresentou resultados satisfatórios frente aos estudos realizados em formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Como analisado, aumento da produção de ERO pode ser o fator desencadeante para alterações ultraestruturais causadas no parasito, levando a morte celular. Além disso, o fármaco mostrou maior seletividade frente ao parasito do que as células dos mamíferos, tornando-o mais seguro. Dessa forma o composto sintético **B-TIOSSEMI** pode ser uma alternativa para o tratamento de pacientes com leishmaniose. No entanto, mais estudos são necessários para comprovação de sua segurança e elucidação mais precisa do mecanismo de ação.

Referências bibliográficas

TAKAHASHI, H. T. et al., **Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass.** *Molecules*, Basel, vol. 16, n. 5, p. 3469-3478, 2011.

TAKAHASHI, H. T.; BRITTA, E. A. **Antileishmanial activity of 5-methyl- from *Porophyllum ruderale* is related to mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*.** p. 330-333, 2013.

BRASIL, 2010. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2ª ed, Brasília, DF, Editora do Ministério da Saúde.

DE CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. **Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease.** *Fitoterapia*, vol. 72, n. 6, p. 599-618, 2001.

LISBOA, A. R.; LEITE, F. C.; DANTAS, A. E. F.; DE OLIVEIRA, I. B.; EVANGELISTA, T. R.; DE SOUSA, J. B. G. **Análise epidemiológica de leishmaniose visceral em Municípios do Sertão Paraibano.** *Revista Brasileira de Educação e Saúde* Pombal, vol.6, n.3, 2016.

MURRAY, H. W.; BERNMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. **Advances in Leishmaniasis.** *The Lancet*, vol. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 24, n. 4, p. 684-703, abr. 1997.