

Subárea do item 7 das Normas de Submissão de Trabalho: 2.10.05 - Farmacologia Bioquímica e Molecular

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE CANDIDATOS A FÁRMACOS LEISHMANICIDAS EM MODELOS *IN VITRO*

Lilyana Waleska Nunes Albuquerque^{1*}; Anderson Brandão Leite¹, Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro³, Lídia Moreira Lima³, Aline Cavalcanti de Queiroz⁴, Magna Suzana Alexandre Moreira^{4,5}

1. Estudante de IC do Laboratório de Farmacologia e Imunidade – ICBS, UFAL
2. Doutorando do Laboratório de Farmacologia e Imunidade – ICBS, UFAL
3. Pesquisador do Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativa - LASSBio-UFRJ
4. Pesquisador do Laboratório de Farmacologia e Imunidade – ICBS, UFAL
5. Orientador

Resumo:

A leishmaniose é uma parasitose encontrada em 98 países, causadas por protozoários da família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania*, transmitida pelo vetor da família Psychodidae, acometendo cerca de 1,3 milhões de pessoas por ano. A terapia farmacológica utilizada atualmente para o tratamento da doença apresenta altas taxas de toxicidade, comprometendo a saúde do infectado por causa das graves reações adversas. O presente estudo tem como objetivo a avaliação farmacológica de candidatos a fármacos imunomoduladores e leishmanicida, planejados e sintetizados no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativa (LASSBio-UFRJ), através da determinação da citotoxicidade dos derivados para a célula hospedeira (macrófagos), utilizando métodos de redução de MTT; assim também como a análise da atividade leishmanicida dos derivados contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Desta forma, observou-se que todos os derivados testados apresentaram efeito citotóxico para macrófagos na concentração de 100 µM, exceto o LASSBio 405.28. Posteriormente, ao avaliar a ação leishmanicida *in vitro* contra promastigotas de *L. amazonensis*, verificou-se que na concentração de 100 µM, os derivados LASSBio 405.36 (efeito leishmanicida de 78,4 ± 2,7%) e LASSBio 405.40 (atividade de 99,6 ± 0,2%) apresentaram efeito antileishmania contra formas promastigotas do parasito. Destaca-se ainda que LASSBio 405.40 apresentou efeito similar ao da pentamidina na mesma concentração testada (induziu redução de 99,6 ± 0,2% do número de promastigotas). De acordo como os resultados obtidos, conclui-se que os derivados LASSBio 405.36 e LASSBio 405.40 apresentaram elevado efeito leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis*.

Autorização legal: Por ser um estudo *in vitro* para avaliação de substâncias sintéticas, não há necessidade de expedição de autorizações junto a Comitês de Ética ou Órgãos Ambientais.

Palavras-chave: Leishmanicida. Imunomodulador. *Leishmania*.

Apoio financeiro: FAPCAL, CNPq, INCT-INOVAR, CAPES, FAPERJ

Introdução:

As leishmanioses são parasitoses causadas por protozoários da família Trypanosomatidae, do gênero *Leishmania*, transmitidas ao homem e outras espécies de mamíferos pelo vetor da família Psychodidae. A leishmaniose é encontrada em 98 países, acometendo cerca de 1,3 milhões de pessoas por ano. No Brasil é de elevada incidência, apresentando no decorrer dos anos uma tendência crescente, sendo que a maioria dos casos se encontram nas regiões Norte e Nordeste, havendo ainda focos importantes na região Centro-Oeste e Sudeste (WHO, 2014).

No entanto, apesar da sua importância epidemiológica, poucas são as alternativas medicamentosas para seu tratamento, consistindo apenas na utilização dos antimoniais pentavalentes como fármacos de primeira escolha, e os de segunda escolha, pentamidina e anfotericina B. Entretanto, estes apresentam altos índices de resistência e toxicidade que podem causar complicações hepáticas, renais e cardiovasculares, ocasionando em alguns pacientes arritmias fatais e até morte súbita (LIMA JUNIOR et al, 2014).

O objetivo geral deste trabalho visa estudar o efeito leishmanicida de séries de derivados sintéticos, planejados e sintetizados no Laboratório de Avaliação e Síntese de Substâncias Bioativa (LASSBio-UFRJ), em colaboração com a Profa. Lídia Moreira Lima – LASSBio-UFRJ e com o Prof. Eliezer Jesus de Lacerda Barreiro – LASSBio-UFRJ, com intuito de descobrir novos candidatos a fármacos leishmanicidas, que constituam opções terapêuticas mais seguras ao tratamento da leishmaniose. Com relação aos objetivos específicos do presente trabalho, o mesmo tem por intuito: Determinar a citotoxicidade dos derivados para a célula hospedeira (macrófagos); analisar a atividade leishmanicida dos derivados contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Metodologia:

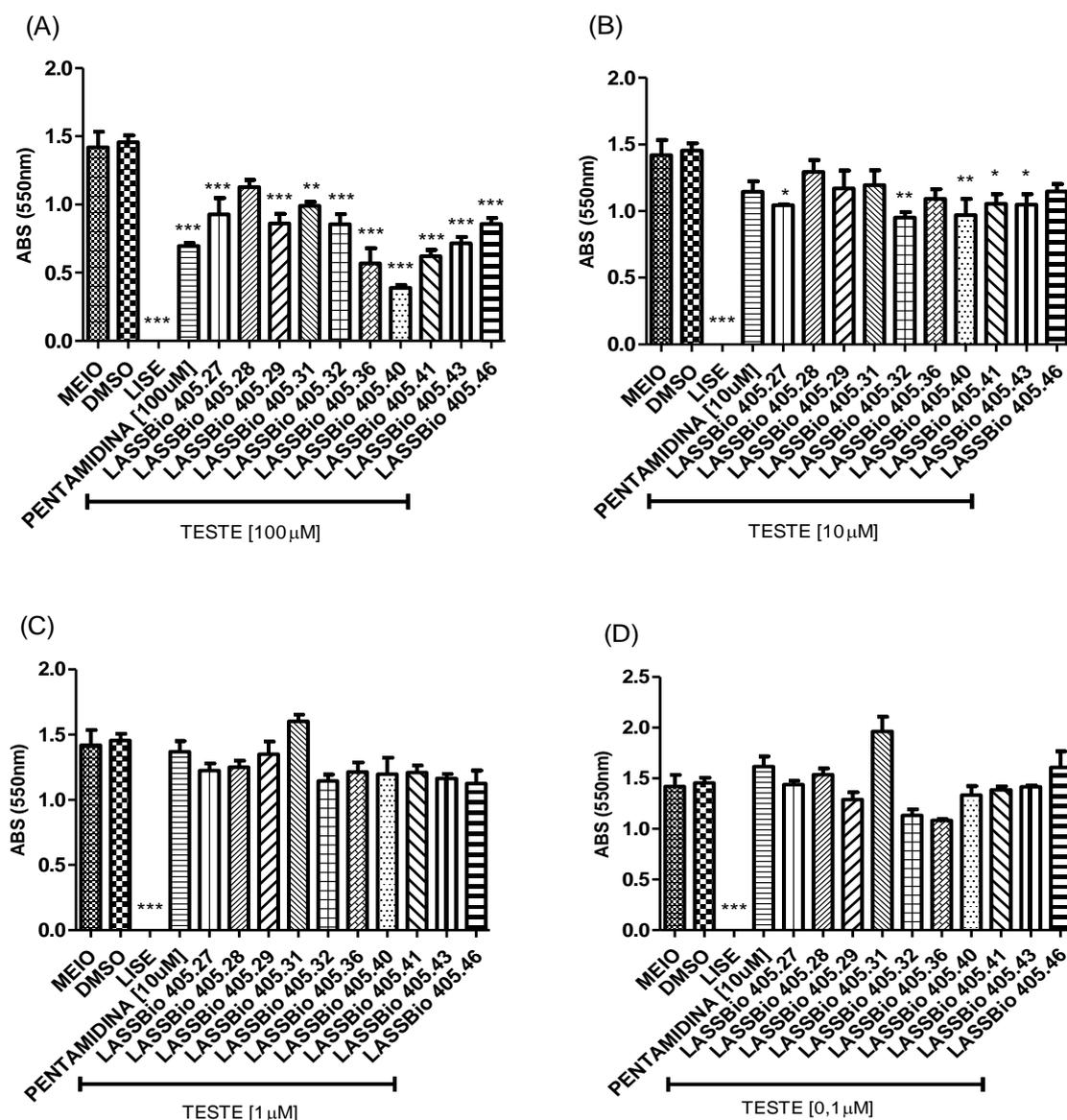
Para a manutenção de linhagem macrófagos foram utilizados macrófagos da linhagem J774.A1 mantidos em garrafas de cultura em 5 ml de meio RPMI com soro. No momento do uso, as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB na concentração de 1 x 10⁵ células/mL e 200 µL

dessa suspensão foram distribuídas em placa de 96 poços (Nunc, Denmark) ou 1×10^5 células /poço de placa de 24 poços com lamínulas. A determinação da viabilidade celular se deu através de macrófagos da linhagem J774.A1 que foram cultivados em triplicatas em placas de 96 poços, na concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço e incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂ por 1 hora, para adesão dos macrófagos ao plástico. Em seguida, os poços foram lavados para remoção das células não aderentes e acrescentadas as diferentes concentrações das substâncias que foram testadas. Os poços controles foram células cultivadas somente com meio de cultura e 10% de SFB (Roche) ou células cultivadas na presença do diluente das substâncias (DMSO, Sigma). A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de redução de MTT (MOSMANN et al., 1993). A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle. A avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* (formas promastigotas), foi realizada através da espécie de *Leishmania. Amazonenses*, plaqueadas numa concentração de 5×10^6 parasitos/poço num volume de 500 μ L em placa de 48 poços com meio Schneider's suplementado com 10% de SFB, 2 mM de L-glutamina, 2% de urina humana. Diferentes concentrações dos diferentes compostos foram adicionadas aos poços contendo as promastigotas e a placa foi incubada em estufa BOD a 27 °C por 48 horas. O número de formas promastigotas foi quantificado através de contagem em câmara de Neubauer, por meio de visualização em microscópio óptico.

Resultados e Discussão:

Preliminarmente, avaliou-se a citotoxicidade das substâncias nos macrófagos de linhagem J774.A1 previamente aderidos. Por meio do método de redução de MTT, realizou-se a análise de viabilidade celular das culturas tratadas com os derivados que estão em fase de testes, como mostrado no Gráfico 1.

Gráfico 1. Efeito citotóxico de pentamidina e dos derivados doadores de óxido nítrico contra macrófagos da linhagem J774.A1.



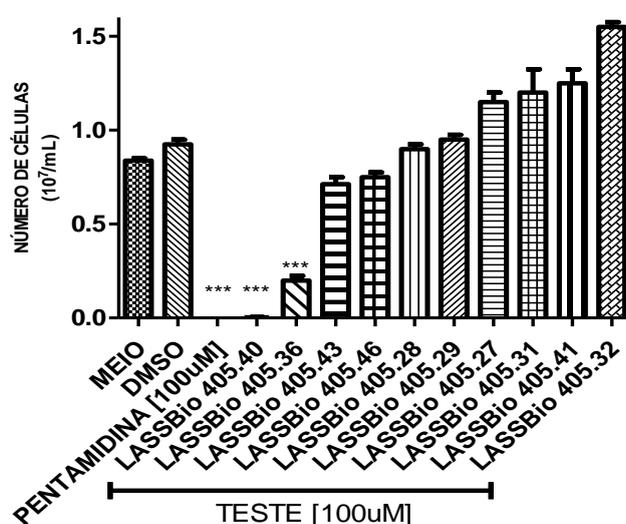
Os resultados revelaram que os compostos LASSBio 405.29, LASSBio 405.32, LASSBio 405.36, LASSBio 405.40, LASSBio 405.41, LASSBio 405.43, LASSBio 405.46 e LASSBio 405.47 apresentaram efeitos

citotóxicos semelhantes à pentamidina, fármaco padrão utilizado no tratamento da leishmaniose, em sua concentração máxima utilizada [100µM] (Gráfico 1A), levando à morte celular. Nesta mesma concentração, o derivado LASSBio 405.31 também apresentou efeito deletério para os macrófagos, porém em menor proporção; já o LASSBio 405.28 não apresentou citotoxicidade para célula hospedeira, comparando-o ao grupo controle DMSO 0,1%. É importante mencionar que não houve indução de morte celular no grupo controle tratado com DMSO 0,1%, caracterizando, desta forma, que o diluente das substâncias não apresentou efeitos citotóxicos significantes na célula.

Como exposto no gráfico 1B, as substâncias LASSBio 405.27, LASSBio 405.32, LASSBio 405.40, LASSBio 405.41 e LASSBio 405.46, mesmo em menor concentração (10 µM) continuaram apresentando efeitos citotóxicos para célula hospedeira. Nas demais concentrações de 1 e 0,1 µM (Gráfico 1C e 1D, respectivamente), nenhum dos compostos causaram morte celular, quando comparados ao controle do veículo (DMSO 0,1%). Além disso, após análise do conjunto de dados obtidos, destaca-se o derivado LASSBio 405.28 por não induzir danos em nenhuma das concentrações testadas.

Após a determinação da citotoxicidade dos derivados, realizou-se a investigação do efeito leishmanicida contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*, como demonstrado no gráfico 2.

Gráfico 2. Efeito leishmanicida de pentamidina e dos derivados doadores de óxido nítrico contra promastigotas de *Leishmania amazonensis*.



Após a análise dos dados obtidos, observou-se que os derivados LASSBio 405.43, LASSBio 405.46, LASSBio 405.28, LASSBio 405.29, LASSBio 405.27, LASSBio 405.31, LASSBio 405.41 e LASSBio 405.32, não apresentaram efeitos leishmanicida na concentração testada (100 µM), ao contrário do composto LASSBio 405.36, que induziu diminuição do número de promastigotas de *L. amazonensis* contadas no microscópio óptico, numa proporção de $78,4 \pm 2,7\%$. Além disso, a substância LASSBio 405.40 também apresentou efeito leishmanicida (indução de morte na proporção de $99,6 \pm 0,2\%$), apresentando atividade semelhante à pentamidina, fármaco tratamento contra a leishmaniose que demonstrou efeito leishmanicida na proporção de $99,8 \pm 0,1\%$.

A série de derivados avaliados foram planejados pelo grupo do LASSBio-UFRJ para serem substâncias doadoras de óxido nítrico. Sabe-se que o óxido nítrico é uma molécula chave para atividade antimicrobiana de macrófagos, incluído defesa contra *Leishmania*. O mecanismo molecular pelo qual óxido nítrico exerce a sua atividade citotóxica não é completamente compreendido. Alguns estudos têm proposto que os efeitos do óxido nítrico são devidos a inibição da respiração mitocondrial, glicólise, peroxidação de lipídeos da membrana, inativação de peroxidases e arginases, perturbações de agregados de Fe-S e mutação do DNA e/ou a inibição da síntese e reparo do DNA (MAUEL e RANSIJN, 1997; GRADONI e ASCENZI, 2004). Desta forma, como perspectiva, pretende-se avaliara a atividade contra formas amastigotas de *Leishmania sp.*, bem como investigar se de fato esses derivados (em especial, LASSBio 405.36 e LASSBio 405.40) têm seu mecanismo de ação associado à liberação de óxido nítrico.

Conclusões:

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o derivado LASSBio 405.28 foi o único na série que não apresentou efeito deletério para célula hospedeira em nenhuma das concentrações testadas. Além disso, LASSBio 405.36 e LASSBio 405.40 demonstraram elevada atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis*, no entanto apresentam efeito deletério na mesma concentração para célula hospedeira. Desta forma, é importante mencionar que a elevada eficácia desses derivados contra promastigotas de *L. amazonensis* dá suporte para continuação da investigação detalhada de seu mecanismo de ação, bem como do seu potencial para o tratamento da leishmaniose, bem como visando o aprimoramento químico através de modificações estruturais nos derivados LASSBio 405.36 e LASSBio 405.40, objetivando a diminuição dos

efeitos citotóxicos observados para célula hospedeira e manutenção dos efeitos leishmanicida.

Referências bibliográficas

ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 2012.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 35, p. 699–705, 2010.

DEN-BOER, M.; ARGAW, D.; JANNIN, J.; et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, p. 1471–1477, 2011.

GRADONI, L.; ASCENZI, P. Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy. *Parassitologia*, v. 46, p. 101–103, 2004.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. of Anti-Inf. T.*, v.8, p.419-433, 2010.

MAUEL, J.; RANSIJN, A. Leishmania spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. **Exp. Parasitol.**, v. 87, p. 98–111, 1997.

MOSMANN, T.. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65:55-63, 1983.

WHO. Leishmaniasis: disease burden and epidemiological trends. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/direction.pdf>>. Acesso em 22 de julho de 2017.