

ALTERAÇÕES INDUZIDAS POR *CALOPHYLLUM BRAZILIENSE* EM PROTOZOÁRIOS DO GÊNERO *LEISHMANIA*

Daniele Stéfanie S. Lopes Lera¹ (PIBIC/CNPq/Uem), Bruna Muller Cardoso¹, Tatiane F. Perles de Mello¹, Thaís Gomes Verzignassi Silveira¹, Maria Valdrinez C. Lonardon¹, (Orientador), e-mail: mvclonardon@uem.br

¹Programa de Iniciação Científica CNPq, ²Depto. de Análises Clínicas e Biomedicina/Universidade Estadual de Maringá/Maringá, PR

Área: 4.00.00.00-1 Ciências da Saúde; Subárea: 4.01.01.09-6 Doenças Infecciosas e Parasitárias

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*, fitoterápicos, apoptose.

Resumo

As leishmanioses são doenças infecciosas não contagiosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e que afetam mais de 12 milhões de pessoas. O tratamento das leishmanioses é de custo elevado e de alta toxicidade. Alguns estudos mostraram que *Calophyllum brasiliense* Camb., família Clusiaceae, tem propriedades antibacterianas, anticancerígena, e sobre *L. (L.) amazonensis*. O objetivo deste trabalho foi estudar a atividade de extratos das folhas de *C. brasiliense* sobre formas promastigotas de *L. (Viannia) braziliensis*, por meio do estudo da indução de fragmentação do DNA nos protozoários tratados com *C. brasiliense*. Por eletroforese em gel de agarose observou-se que 60 µg/mL do extrato de *C. brasiliense* induz a fragmentação do DNA em promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, o que poderia desencadear a morte celular por apoptose nestes parasitos. Estudos complementares devem ser realizados, os quais possibilitem a identificação de outras características bioquímicas e morfológicas de apoptose.

Introdução

As leishmanioses são uma das mais importantes doenças negligenciáveis, com uma estimativa de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos anuais no mundo (WHO, 2015). O arsenal terapêutico para o tratamento das leishmanioses é limitado e as drogas atualmente usadas, como os antimoniais pentavalentes, as pentamidinas e a anfotericina B, embora efetivas, tem severos efeitos colaterais e limitações de uso. O estudo de fontes naturais como o



Calophyllum brasiliense Camb para o desenvolvimento de novos compostos é uma alternativa. Estudos com o *C. brasiliense* Camb., planta da família *Clusiaceae*, mostram que seus extratos e frações tem atividade anti-*Leishmania*. Brenzan et al (2008) mostraram que um extrato diclorometano e a cumarina (-)mammaea A/BB obtidos a partir de folhas de *C. brasiliense* tem atividade contra promastigotas e amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Honda et al (2010) mostraram que a fração hexano, obtida das folhas de *C. brasiliense* reduziu o volume das lesões em camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e cicatrização das lesões tratadas topicamente. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade de extratos das folhas de *C. brasiliense* sobre formas promastigotas de *L. (Viannia) braziliensis*, por meio do estudo da indução de fragmentação do DNA dos parasitos.

Materiais e métodos

Preparação do extrato hidro-alcóolico de Calophyllum brasiliense

O extrato foi obtido a partir das folhas, por maceração fria em etanol:água (9:1), filtração e evaporação à vácuo em rota-evaporador a 35°- 40°C. O resíduo verde escuro foi dissolvido em diclorometano. O solvente foi eliminado por rota-evaporação à vácuo a 45°C e o extrato armazenado a -10°C, protegido da luz, até o uso.

Fragmentação do DNA induzida por Calophyllum brasiliense

A análise qualitativa de fragmentação do DNA foi realizada por eletroforese em gel de agarose 2% do DNA genômico extraído de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (1×10^8) tratadas ou não com extrato diclorometano de *C. brasiliense*, na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ (DL_{50} conforme BREZZAN et al., 2008). Parasitos tratados com 12 μL de peróxido de hidrogênio foram usados como controle positivo da fragmentação. Formas promastigotas foram lisadas em tampão Sarkosyl (50 mM Tris, 10 mM EDTA, 0,5 % sodium-N-lauryl sarcosine [pH 7,5]) e com proteinase K (100 $\mu\text{g/mL}$) e incubadas 6 a 12 e 24 h a 50°C. Após a adição de RNase A (248 U/mL) a solução foi incubada por 1 h a 37°C e a seguir extraídas com fenol:clorofórmio-álcool isopropílico (25:24:1) e centrifugadas a 16.000g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram tratados com 0,1 volume de acetato de sódio 3 M e 2 volumes de etanol por 20 a 24 h, a 20°C, centrifugados a 16.000g por 10 minutos e lavados em etanol 95%. O DNA foi seco à temperatura ambiente, dissolvido em 10 mM Tris-EDTA e quantificado por espectrofotometria a 260/280 nm. O DNA genômico (10 μg) foi aplicado em gel de agarose a 2% contendo brometo de etídio e a eletroforese realizada a 100V por 45 minutos e visualizados sob luz UV.

Resultados e Discussão

A eletroforese do DNA de formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* tratadas (60 $\mu\text{g/mL}$) ou não com o extrato de *C. brasiliense* (Figura 01) mostrou um padrão de bandas semelhante ao dos parasitos tratados com 12 μL de peróxido de hidrogênio, após 6, 12 e 24h de incubação, o qual foi ausente nos controles não tratados. Tal fato indica que o extrato de *C. brasiliense* pode induzir a fragmentação do DNA de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Estes resultados sugerem que o mecanismo de ação do extrato sobre formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* está associado à indução de morte celular por apoptose.

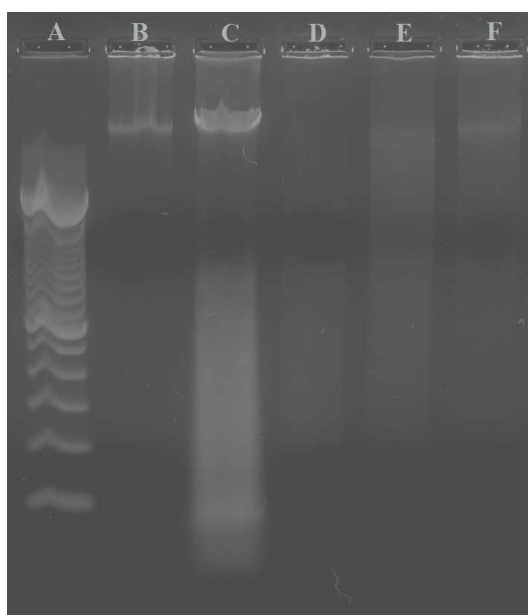
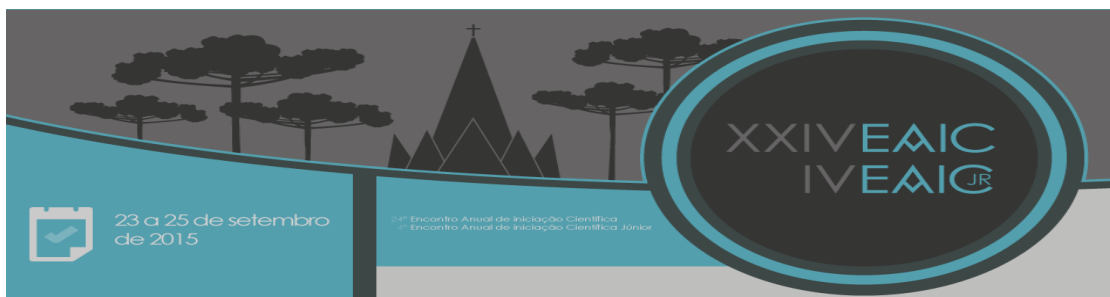


Figura 1. Fragmentação do DNA de *L. (V.) braziliensis* tratadas com *C. brasiliense*. Promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram tratadas com 60 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *C. brasiliense* ou com peróxido de hidrogênio ou não tratadas. Após 12h e 24 h foi realizada a eletroforese e a revelação sob luz U.V. Peso molecular 100 (A); *L. (V.) braziliensis* não tratadas (B); *L. (V.) braziliensis* tratadas com 60 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de *C. brasiliense* (C); *L. (V.) braziliensis* tratadas com 12 μL de peróxido de hidrogênio por 6 h (D), 12h (E) e 24h (F).

O padrão de alterações morfológicas e bioquímicas associadas com a apoptose celular inclui a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear, condensação de cromatina (MELO et al., 2000), despolarização de membrana mitocondrial, fragmentação inter-nucleossomal do DNA e alterações



na assimetria de fosfolipídios de membrana plasmática (CURTIN et al., 2002). No entanto, para se afirmar que houve a indução de um processo de apoptose é necessário que todas as características morfológicas e bioquímicas citadas acima seja observadas, o que requer técnicas mais complexas. Assim, testes complementares que possibilitem a visualização das outras características bioquímicas e morfológicas de apoptose são necessários.

Conclusões

Por eletroforese em gel de agarose foi possível demonstrar que 60 $\mu\text{g/mL}$ do extrato de diclorometano de *C. brasiliense* induz a fragmentação do DNA de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Estes resultados permitem supor que o mecanismo de morte celular desencadeado pelo extrato é o de apoptose. A partir disso, é viável a realização de estudos complementares em busca de mais informações sobre a indução dos eventos de apoptose por *C. brasiliense* em *L. (V.) braziliensis*. Técnicas de microscopia eletrônica e de identificação de outros marcadores de apoptose deverão ser realizadas.

Agradecimentos

Ao CNPq/PIBIC/UEM pela concessão da bolsa.

Referências

- BRENZAN MA, FERREIRA ICP, LONARDONI MVC, HONDA PA; FILHO ER; NAKAMURA CV, FILHO BPD, UEDA-NAKAMURA T, CORTEZ DAG. Activity of Extracts and Coumarins from the Leaves of *Calophyllum brasiliense* on *Leishmania braziliensis*. *Pharmaceutical Biology*, 46: 380–386, 2008.
- CURTIN JF, DONOVAN M, COTTER TG. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. *J. Immunol. Methods.*, n. 265, p. 49-72, 2002.
- HONDA PA, FERREIRA ICP, CORTEZ DAG, AMADO CAB, SILVEIRA TGV, BRENZAN MA, LONARDONI MVC. Efficacy of components from leaves of *Calophyllum brasiliense* against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Phytomedicine*, 17: 333–338, 2010.
- MELO PS, MARIA SS, VIDAL BC, HAUN M, DURAN N. Viocetin cytotoxicity induction of apoptosis in V79 cells, *In Vitro Cell. Dev. Bio. Anim.*36: 539-543, 2000.
- WHO (World Health Organization). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> consultado em 10/06/2015, 2015.