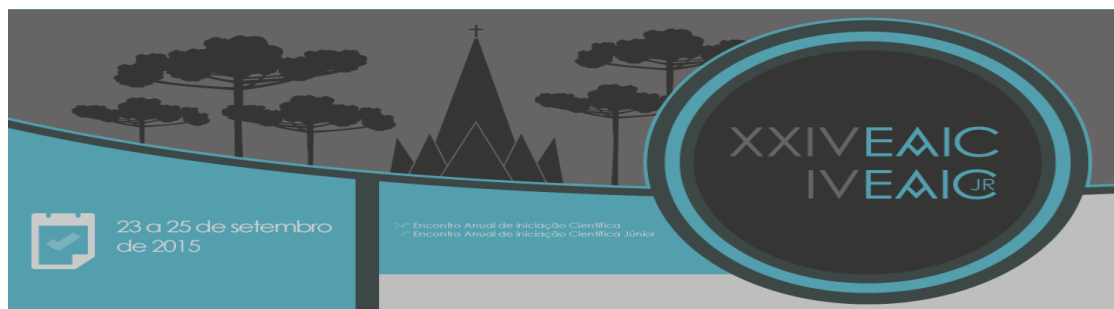




ATIVIDADE CITOTÓXICA E LEISHMANICIDA DO LÁTEX DE *TABERNAEMONTANA FUCHSIAEFOLIA* (APOCYNACEAE)

Áquila Carolina F. H. Ramos¹, Thaís G. V. Silveira², Arildo J. B. de Oliveira²,
Maria Valdrinez C. Lonardoni² . e-mail: mvclonardoni@gmail.com

¹Iniciação Científica do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá-PR

²Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina da Universidade Estadual de Maringá-PR

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

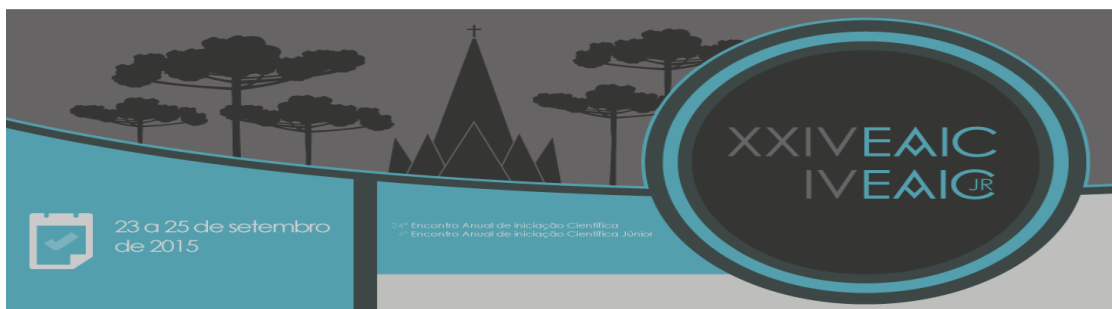
Palavras-chave: Leishmaniose, Tegumentar Americana, fitoterápico.

Resumo

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, parasitos intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. No Brasil a incidência de leishmaniose tegumentar americana aumentou nas últimas décadas e os principais agentes etiológicos são *L. (Viannia) braziliensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*. Plantas do gênero *Tabernaemontana* são utilizadas na medicina popular para tratar doenças como diarreia, afecções da pele, verrugas, sífilis, hanseníase, câncer e picada de insetos. Estudos mostram as propriedades desta planta contra o *Plasmodium falciparum in vitro*. O tratamento das leishmanioses é feito à base de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas. São medicamentos de alto custo, com eficácia variável e alta toxicidade. Nos últimos anos, os estudos com plantas mostram resultados promissores na busca de novas drogas com atividade leishmanicida. Neste estudo busca-se investigar a atividade citotóxica e leishmanicida do látex de *T. fuchsiaefolia* (Apocynaceae) para macrófagos J774-A1 e formas promastigotas de *L. (L.) amazonenses*.

Introdução

As leishmanioses são doenças infecciosas não contagiosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, família *Trypanosomatidae* e representam um sério problema de saúde pública [1]. Estes parasitos são intracelulares obrigatórios de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro. A leishmaniose tegumentar americana (LTA), no Brasil, tem como agentes etiológicos *Leishmania (Viannia) braziliensis*, implicada nas



formas cutânea e mucosa, e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, responsável pela leishmaniose cutânea difusa, a forma mais severa da doença [3]. O controle ou a progressão da leishmaniose no hospedeiro vertebrado depende de componentes da resposta imune inata e específica, assim como da capacidade do parasita de se evadir dos mecanismos de defesa do hospedeiro [2].

Para o tratamento das leishmanioses são usados os antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas. São medicamentos de alto custo, com eficácia variável e alta toxicidade. Nos últimos anos, os estudos com plantas mostram resultados promissores na busca de novas drogas com atividade leishmanicida [4].

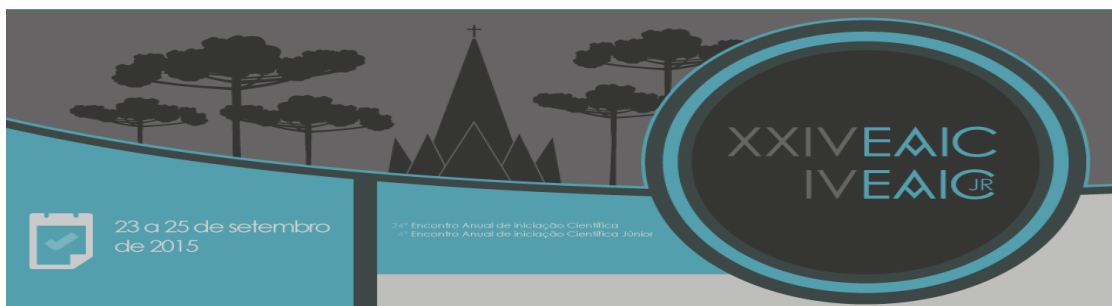
Dentre os gêneros da família *Apocynaceae*, *Tabernaemontana* é produtor de uma grande variedade de compostos, tendo como principais constituintes alcalóides indólicos monoterpênóides, uma classe de substâncias com uma vasta gama de atividades farmacológicas [5]. Alguns estudos mostraram as propriedades desta planta contra o *Plasmodium falciparum in vitro*. O extrato bruto obtido a partir do caule de *Tabernaemontana fuchsiaefolia* apresentou atividade depressora no sistema nervoso central e de estimulação espontânea em útero isolado de rata. A escassez de dados sobre a atividade do látex de *T. fuchsiaefolia* sobre espécies de *Leishmania* mostra a relevância dessa pesquisa, que tem como objetivos avaliar a atividade citotóxica e leishmanicida do látex sobre macrófagos J774-A1 e formas promastigotas de *L. (L.) amazonenses*, respectivamente, determinando a CC₅₀ (concentração citotóxica capaz de inibir 50% dos macrófagos) e a DL₅₀ (dose letal capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitas), bem como o índice terapêutico de seletividade (TSI).

Materiais e métodos

- Obtenção do látex: o látex obtido por incisões superficiais nos diferentes órgãos das plantas de *T. fuchsiaefolia* (caule, folha e frutos) foi submetido a centrifugação, o sedimento descartado e a fase solúvel foi congelada, posteriormente liofilizada, obtendo-se assim o extrato de látex bruto seco, estocado a -20°C e reconstituído no momento de uso.

- Cultura e manutenção de *Leishmania (L.) amazonensis*: promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas a 25°C em meio de cultura 199, suplementado com 10% soro bovino fetal, 1% de urina humana, 20 mM de L-glutamina e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina). Os parasitos foram mantidos por repiques semanais.

- **Atividade leishmanicida do látex** sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*: a viabilidade de promastigotas tratadas com a droga em diferentes concentrações (1000µg/mL até 0,49µg/mL) foi determinada pelo ensaio colorimétrico XTT. O látex de *T. fuchsiaefolia* foi diluído em uma



placa de 96 poços e a seguir foram adicionadas $4 \times 10^6/100\mu\text{L}$ formas promastigotas em fase logarítmica de crescimento. Após 24h, 48h e 72h a 25°C , as placas foram centrifugadas 2500 rpm/10 min e o sobrenadante removido. A seguir, 100 μL de XTT (500 $\mu\text{g/mL}$) ativado com metossulfato de fenazina (PMS) em salina 0,9% foram adicionados a cada poço. Após 3h a 37°C a absorbância do composto formazam originado foi determinada por espectrofotometria (450 nm/filtro de 620nm). A dose 50% letal ($\text{LD}_{50}/24\text{h}$, 48h, 72h) foi calculada a partir da regressão linear do percentual de morte. Os testes foram feitos em triplicata e repetidos três vezes.

- **Citotoxicidade do látex:** macrófagos J774 A.1 foram cultivados em meio de cultura RPMI suplementado (10% de soro bovino fetal, 100 U/mL de penicilina G e 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina), em placas de 96 poços e tratados com diferentes concentrações do látex (1000 $\mu\text{g/mL}$ até 0,49 $\mu\text{g/mL}$). Após 24h e 48h a 37°C e 5% de CO_2 , as placas foram centrifugadas a 1000 rpm/10 min, o sobrenadante removido e 100 $\mu\text{g/mL}$ de XTT ativado com PMS (metossulfato de fenazina) foram adicionados a cada poço. Após 3h a 37°C a absorbância foi determinada por espectrofotometria (450 nm/filtro de 620nm). A citotoxicidade foi dada pela concentração tóxica para 50% das células (24h e 48h) e calculada pela regressão linear do percentual de toxicidade. Os ensaios foram feitos em triplicata e repetidos três vezes.

Resultados e Discussão

O látex de *T. fuchsiaefolia* apresentou atividade leishmanicida com DL_{50} de 929 $\mu\text{g/mL}$, 921,08 $\mu\text{g/mL}$ e 867,25 $\mu\text{g/mL}$ em 24h, 48h e 72h, respectivamente, de incubação com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (figura 01). Os ensaios de citotoxicidade para macrófagos J774 A.1 resultaram em CC_{50} de 166,98 $\mu\text{g/mL}$ em 24h e 219 $\mu\text{g/mL}$ em 48h (figura 02). O índice terapêutico de seletividade (TSI) do látex de *T. fuchsiaefolia* foi de 5,6 e 4,2 em 24h e 48h, respectivamente.

Conclusões

O látex de *T. fuchsiaefolia* apresentou atividade leishmanicida, porém em altas doses. Observa-se que nas doses letais aos parasitos o látex apresenta elevada toxicidade. O TSI também infere a proximidade da dose que causa o efeito desejado e a dose tóxica (24h e 48h, $\text{TSI} < 10$). Considerando que o látex de *T. fuchsiaefolia* é uma mistura complexa de compostos, novos estudos com componentes purificados são necessários para melhor avaliação de sua potencial atividade anti-*Leishmania*.

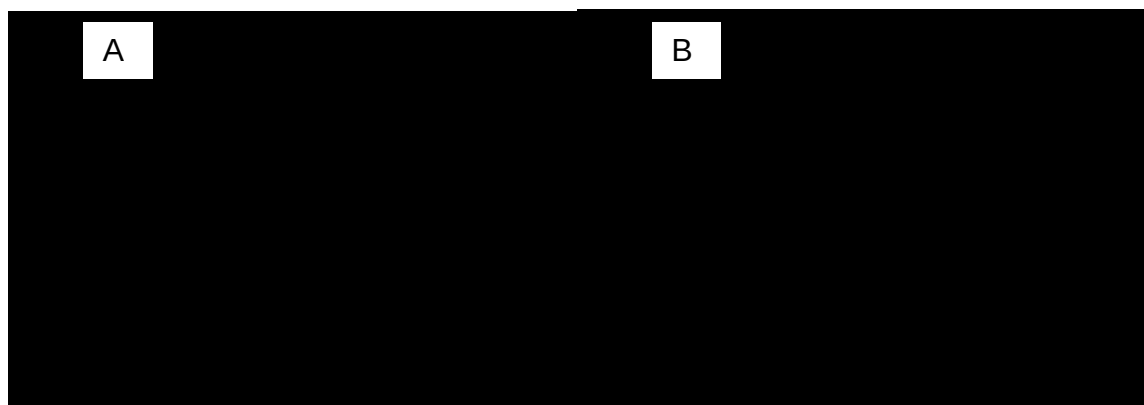
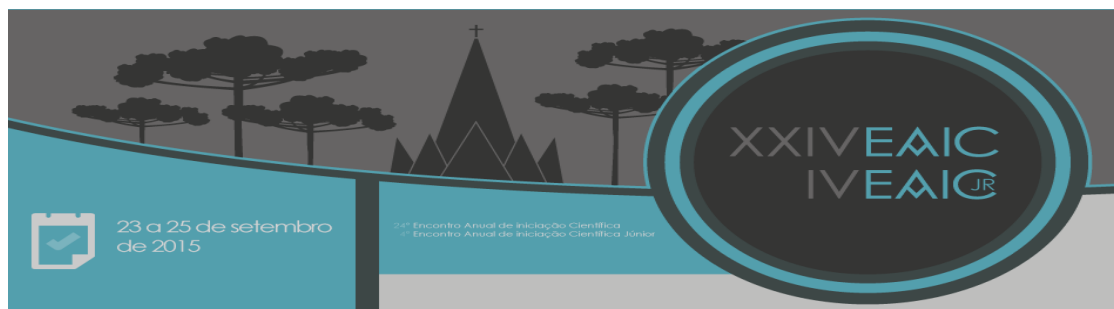


Figura 1: Atividade do látex de *T. fuchsiaefolia*. *L. (L.) amazonensis* (A) ou macrófagos J774 A.1 (B) foram cultivados com diferentes concentrações (1000 a 0,49 µg/mL) do látex de *T. fuchsiaefolia*. Após 24, 48 e 72h para os parasitos e 24 e 48h para os macrófagos, a atividade foi avaliada pelo método do XTT. Os resultados são as médias de três experimentos em triplicatas.

Agradecimentos

Ao CNPq por possibilitar essa pesquisa, a prof^a Maria Valdrinez C. Lonardoni pelas orientações e ao Laboratório de Imunologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá.

Referências

1. Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. *Acta Tropica*. 2008;105(1):1–9. [PubMed]
2. A. C. Cunningham. "Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 72, no. 2, pp. 132–141, 2002.
3. MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana. 2. ed. Brasília, 2010.
4. Newman, D.J., Cragg, G.M., Gordon, M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70, 461–477.
5. Van Beek TA, Verpoorte R, Svendsen AB, Leeuwenberg AJM, Bisset NG. *Tabernaemontana* L. (Apocynaceae): A review of its taxonomy, phytochemistry, ethnobotany and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology*. 1984; 10(1):1-156.