



INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DA ACILTIOSEMICARBAZIDA (ATZ-S-04) EM AMASTIGOTA INTRACELULAR E ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS EM PROMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis*

Alex Graça Contato (PIBIC-AF/Fundação Araucária/UEM), Vanessa Kaplum (PCF/UEM), Celso Vataru Nakamura (Orientador), e-mail: cvnakamura@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/Departamento de Ciências Básicas da Saúde/Centro de Ciências da Saúde/Maringá, PR.

Microbiologia – Microbiologia Médica

Palavras-chave: leishmaniose, *Leishmania amazonensis*, aciltiossemicarbazidas do limoneno.

Resumo:

A leishmaniose afeta cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiproliferativa dos compostos aciltiossemicarbazidas derivados do limoneno em amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* e, alterações ultraestruturais em promastigotas tratadas com ATZ-S-04. Os compostos ATZ-S-02, ATZ-S-03 e ATZ-S-04 apresentaram resultados promissores em amastigotas intracelulares. O composto ATZ-S-04 provocou alterações ultraestruturais em promastigotas, com aumento da secreção do complexo de Golgi e aumento nas vesículas presentes na bolsa flagelar. No entanto, estudos adicionais deverão ser realizados para comprovar eficácia no tratamento de leishmaniose.

Introdução

A leishmaniose é uma doença zoonótica, endêmica em 98 países. Causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que alternam entre as formas promastigotas e amastigotas (WHO, 2014). A primeira linha de tratamento consiste no uso de antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®) (LIMA et al, 2007). Drogas anti-inflamatórias não-esteroidais (NSAIDs), como as aciltiossemicarbazidas, vem sendo empregadas no tratamento de leishmanioses (MACIEL; ECHEVARRIA; RUMJANEK, 1998). O limoneno, um composto encontrado principalmente



em frutas cítricas, é muito utilizado na síntese de novos compostos (BICÁS & PASTORE, 2007). Portanto, os objetivos do trabalho foram avaliar a atividade antiproliferativa dos compostos aciltiossemicarbazidas derivados do limoneno em amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* e, as alterações ultraestruturais em promastigotas tratadas com ATZ-S-04.

Materiais e métodos

Ensaio antiproliferativo em amastigotas intracelulares de L. amazonensis

Os macrófagos peritoneais (5×10^5 cels/mL) foram colocados nos poços da placa de 24 poços já contendo lamínula redonda, e incubados por 2 h a 37°C e 5% de CO_2 . Macrófagos peritoneais que aderiram à lamínula de vidro foram infectados com promastigotas de cultura em fase estacionária de crescimento ($3,5 \times 10^6$ cels/mL), com 10% de SFB, por 4 h a 34°C e 5% de CO_2 . Após a incubação, macrófagos peritoneais infectados foram tratados ou não com diferentes concentrações dos compostos ATZ-R-01, ATZ-R-2, ATZ-R-03, ATZ-R-04, ATZ-S-01, ATZ-S-02, ATZ-S-03 e ATZ-S-04 (1, 5, 10 e 25 μM) por 48 h a 34°C e 5% de CO_2 . Depois do tratamento, as lâminas foram fixadas com metanol por 10 min. e coradas Giemsa por 40 min. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Olympus CX31), onde 200 células foram contadas em imersão com o objetivo de quantificar o Índice de Sobrevivência (Is), conforme equação abaixo:

$$Is = \frac{\% \text{ MO infectados} \times n^\circ \text{ amo por MO infectado}}{n^\circ \text{ MO contados}}$$

Com o Is pode-se calcular o percentual de inibição do crescimento de 50% das amastigotas intracelulares em relação ao controle (IC_{50}).

Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de L. amazonensis

As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas ou não com IC_{50} do composto ATZ-S-04 por 72 h. As células foram fixadas com 2,5% de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,4) a temperatura ambiente por 2 h, para então serem pós – fixadas com tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% por 60 min. As células foram desidratadas em concentrações crescentes de resina epon, para então ser polimerizado em estufa a 60°C por 72 h. Em seguida, os blocos foram cortados em ultramicrotomo e, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. A visualização foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão (JEOL JEM 1400).



Resultados e Discussão

A Tabela 01 mostra os resultados do ensaio antiproliferativo em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, tratadas com as aciltiossemicarbazidas derivadas do limoneno. Dentre os compostos testados, três compostos apresentaram resultados promissores com relação à atividade antiproliferativa sendo estes, o ATZ-S-02, ATZ-S-03 e ATZ-S-04.

Tabela 01. Ensaio antiproliferativo para amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis* com as aciltiossemicarbazidas derivadas do limoneno.

Composto	Massa molecular (g/mol)	Amastigotas intracelulares IC ₅₀ (μM)
ATZ-R-01	269,41	>25
ATZ-R-02	331,48	>25
ATZ-R-03	345,50	>25
ATZ-R-04	332,46	>25
ATZ-S-01	269,41	>25
ATZ-S-02	331,48	15,97 ± 3,61
ATZ-S-03	345,50	18,27 ± 1,69
ATZ-S-04	332,46	15,90 ± 2,88

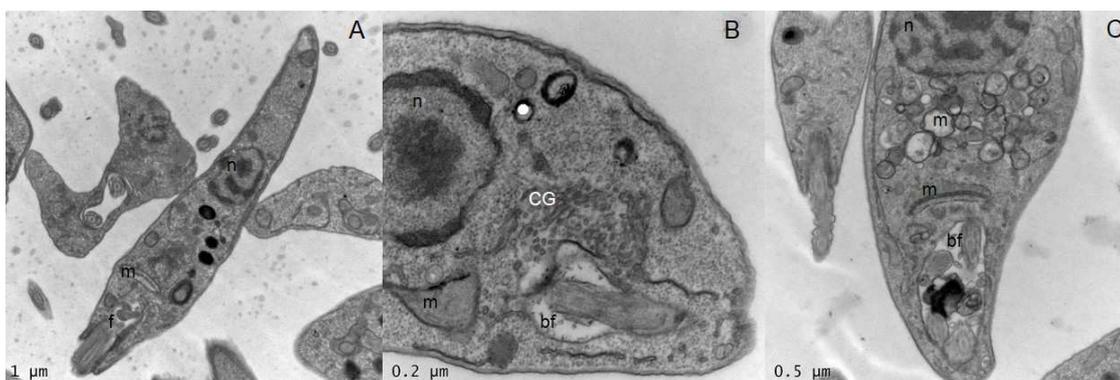


Figura 01. (MET) de formas promastigotas de *L. amazonensis* por 72 h. (A) Parasitos não – tratados apresentaram ultraestrutura normal, com mitocôndria (m), núcleo (n) e flagelo (f).

Tratamento com o composto ATZ-S-04 (IC₅₀) apresentou alterações como aumento da atividade secretória do complexo de Golgi (B) e presença de vesículas na bolsa flagelar (C).

As diferenças ultraestruturais das formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com ATZ-S-04 foram evidenciadas por microscopia eletrônica de transmissão. As formas promastigotas não tratadas apresentaram ultraestrutura normal, com presença de núcleo, mitocôndria, cinetoplasto e flagelo (Figura 1A).



Entretanto, parasitos tratados com IC₅₀ do ATZ-S-04, apresentaram alterações ultraestruturais, como aumento da atividade secretória do complexo de Golgi (Figura 1B) e presença de vesículas na bolsa flagelar (Figura 1C). As alterações no complexo de Golgi podem estar relacionadas com mudanças na via de biossíntese – secreção, já que algumas enzimas envolvidas na biossíntese de lipídeos estão localizadas no complexo de Golgi (GODINHO et al., 2013).

Conclusões

Conclui-se que o composto ATZ-S-04 apresentou a melhor atividade antiproliferativa em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, além de alterações ultraestruturais em promastigotas. No entanto, estudos adicionais deverão ser realizados para comprovar eficácia no tratamento da leishmaniose.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pela bolsa de IC concedida a A. G. Contato.

Referências

BICAS, J. L.; PASTORE, G. M. Isolation and screening of *D* – limonene - resistant microorganisms. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 38, p. 563 – 567, 2007.

GODINHO, J. L. P.; GEORGIKOPOULOU, K.; CALOGEROPOLOU, T.; SOUZA, W. de; RODRIGUES, J. C. F. A novel alkyl phosphocoline – dinitroaniline hybrid molecule exhibits biological activity *in vitro* against *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 153 – 165, 2013.

LIMA, E. B. de; PORTO, C.; MOTTA, J. O. C. da; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **An. Bras. Dermatol.**, v. 82, n. 2, p. 111 – 124, 2007.

MACIEL, M. A. M.; ECHEVARRIA, A.; RUMJANEK, V. M. Isolamento e caracterização de acil – tiossemicarbazidas como intermediários na síntese de compostos mesoiônicos. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 569 - 572, 1998.

WHO, W. H. O. Leishmaniosis. Ficha n. 375, Geneva, 2014.