



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO LÁTEX DE *Tabernaemontana catharinensis* SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS DE *Leishmania (L.) amazonensis* E CITOTOXICIDADE EM ERITRÓCITOS

Bruna G. Sydor (PIBIC/FA/UEM), Áquila Carolina F. H. R. Milaré (Mestranda/PCS), Thaís Gomes Verzignassi Silveira, Maria Valdrinez C. Lonardoni (Orientadora). E-mail: mvclonardoni@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/ Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina/Maringá-PR

Área e subárea do conhecimento: 2.00.00.00-6 Ciências Biológicas; 2.13.01.00-0 Protozoologia de Parasitos.

Palavras-chave: *Leishmania (L.) amazonensis*, leishmaniose tegumentar americana, fitoterápicos

Resumo

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania* e que se caracteriza por úlceras no local da picada da fêmea do inseto flebotomíneo. O tratamento disponível atualmente provoca diversos efeitos colaterais. Dessa maneira, terapias com fontes naturais, de baixo custo e que representam pouca ou nenhuma reação adversa, é de extrema importância. Plantas do gênero *Tabernaemontana* já são conhecidas por suas propriedades medicinais. Com base nisso, o presente trabalho avaliou a atividade leishmanicida do extrato bruto do látex de *Tabernaemontana catharinensis* A. sobre formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Observou-se que o índice de infecção (percentual de macrófagos infectados x número médio de amastigotas por macrófago) diminuiu em relação aos controles não tratados. Assim, na concentração de 2000 µg/mL do látex, houve redução significativa ($p=0,047613$) do índice de infecção (de 69,13%); porém as concentrações menores (1000 µg/mL e 500 µg/mL) não mostraram resultados significativos. Investigou-se também a citotoxicidade para hemácias, observando-se que as concentrações de 31,25 µM a 1000 µM não foram hemolíticas. Verificou-se também a estimulação para a produção de óxido nítrico por macrófagos J774.A1, após 24 e 48 horas de incubação com o látex, nas mesmas concentrações, detectando-se uma redução significativa da estimulação da produção de óxido nítrico em relação às células não tratadas.





Introdução

Com uma incidência de 2 a 2,5 milhões de novos casos por ano no mundo, a leishmaniose é endêmica em 98 países [5] e a forma cutânea ou tegumentar (LTA) é a manifestação clínica mais comum. O Brasil se enquadra entre os países com maiores índices de LTA, que é causada por variadas espécies do gênero *Leishmania*. A forma mais severa, embora rara, é a leishmaniose cutânea difusa cuja espécie responsável é a *L. (Leishmania) amazonensis*.

Este parasita alterna seu ciclo de vida em dois tipos morfológicos: promastigotas (flageladas) e amastigotas (aflageladas) [3] e o tratamento é realizado com antimoniais pentavalentes [2], que implicam em diversos efeitos colaterais, elevado custo, administração difícil e podem causar resistência ao parasito [1]. Assim, os fitoterápicos são alternativas necessárias para o tratamento da LTA e plantas da espécie *Tabernaemontana catharinensis* A. DC já mostraram atividade antitumoral, antioxidante, analgésica, antiinflamatória e também anti-*Leishmania* [4].

O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade leishmanicida do extrato bruto do látex de *T. catharinensis* sobre formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, avaliar a produção de óxido nítrico bem como investigar a citotoxicidade para eritrócitos, visando o seu uso como uma nova estratégia para o tratamento da LTA.

Materiais e métodos

Coleta do látex: o extrato bruto do látex foi obtido por incisões superficiais em diferentes partes da planta *T. catharinensis*, estocado a -20°C e reconstituído para o uso.

Cultura e manutenção de *Leishmania (L.) amazonensis*: formas promastigota foram cultivadas em meio de cultura 199 suplementado com soro bovino fetal 10% e antibióticos (100 U/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina), incubados a 25°C e mantidas por repiques semanais.

Atividade sobre formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*: macrófagos J774.A1 foram distribuídos em placas de 24 poços (5×10^5 células/poço), cultivados em meio de cultura RPMI sobre lamínulas de vidro e incubados por 2 horas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2 . A seguir foram infectados com formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (10:1) e incubados por mais 4 h. O látex foi adicionado nas concentrações de 2 mg/mL, 1 mg/mL e 0,5 mg/mL. Após 24 horas o sobrenadante foi coletado para dosagem de óxido nítrico, e as lamínulas removidas, lavadas em PBS, fixadas em metanol e coradas com Giemsa. Foi determinado o índice de





infecção (percentual de macrófagos infectados x número médio de amastigotas por macrófago).

Citotoxicidade para hemácias: diferentes concentrações do látex foram cultivadas com uma suspensão de hemácias em placas de cultura de 96 poços. Após incubação a percentagem de hemólise foi avaliada nos sobrenadantes.

Determinação de nitrito: os níveis de óxido nítrico foram avaliados indiretamente pela determinação de nitritos com o reagente de Griess. A concentração de nitrito foi determinada a 530 nm, com base em uma curva padrão de nitrito de sódio.

Resultados e Discussão

Os resultados demonstraram que o extrato bruto do látex de *T. catharinensis* tem atividade leishmanicida na concentração de 2000 µg/mL ($p= 0,047613$), reduzindo o índice de infecção em 69,13% em relação aos controles. Porém as concentrações menores (1000 µg/mL e 500 µg/mL) não apresentaram diferença estatisticamente significativa (Figura 1). O látex não foi citotóxico para eritrócitos e não houve estimulação da produção de óxido nítrico por macrófagos J774.A1 após 24 e 48 horas de incubação. Interessantemente, observou-se que após 24 horas de incubação ocorreu uma inibição significativa da produção deste mediador em relação aos controles não tratados.

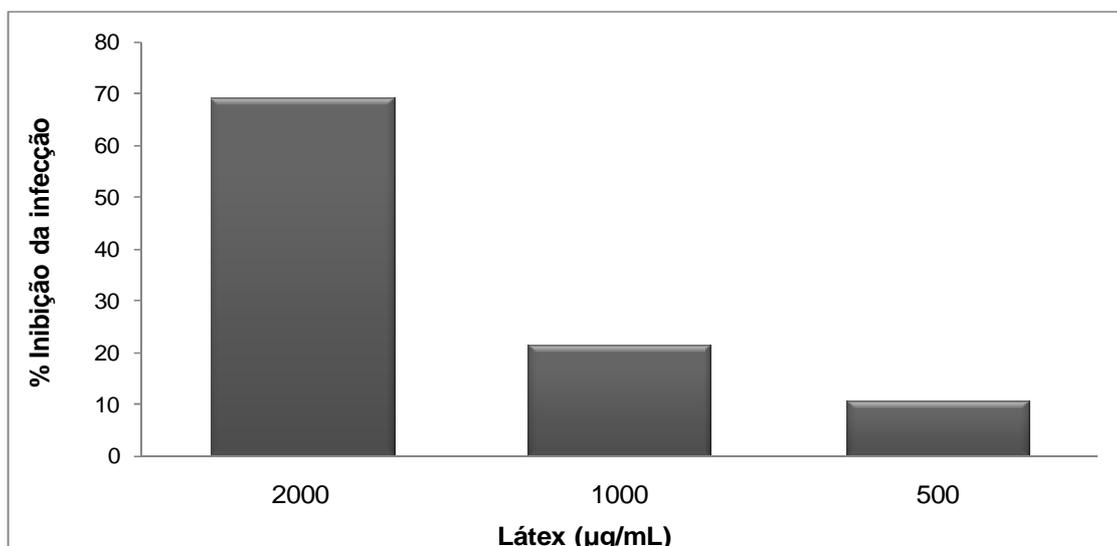


Figura 1 – Percentagem de inibição do índice de infecção em macrófagos infectados com amastigotas de *L. (L.) amazonensis* e tratados com extrato do látex de *T. catharinensis*.





Conclusões

O látex de *T. catharinensis* apresentou atividade leishmanicida para formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, mas em uma dose relativamente elevada, mas não foi tóxico para eritrócitos. O potencial anti-*Leishmania* dessa espécie vegetal deverá ser investigado, como forma de incentivo a novos tratamentos com fitoterápicos.

Agradecimentos

Agradeço à Fundação Araucária por ter possibilitado o financiamento desta pesquisa, a professora Maria Valdrinez pela orientação e a todos do Laboratório de Imunologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá.

Referências

1. BEZERRA, J. L.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; CARVALHO, I. C. D. S.; PATRÍCIO, F. J.; SOUSA, S. M.; AMARAL, F. M. M.; REBELO, J. M. M.; GUERRA, R. N. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, vol. 16(Supl.), p. 631-637, 2006.
2. GIL, E. S.; PAULA, J. R.; NASCIMENTO, F. R. F.; BEZERRA, J. C. B. Produtos naturais com potencial leishmanicida. **Revista de Ciências Farmacêuticas básica e aplicada**, v. 29, n. 3, p. 223-230, 2008.
3. NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.
4. RATES, S. M. K.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SOUZA, I. A.; HENRIQUES, A. T. Chemical constituents and pharmacological activities of *Peschiera australis*. **International Journal of Pharmacognosy**, vol. 31, p.288-294, 1993.
5. VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, vol. 16, p. 99–109, 2015.

