

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO CINAMALDEÍDO SOBRE AS FORMAS AMASTIGOTAS DE Leishmania (Leishmania) amazonensis.

Aline Ávila Brustolin, Tatiane França Perles Mello, Thais Gomes Verzignassi Silveira, e-mail: a.a.brustolin@hotmail.com.

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

Área e subárea do conhecimento: Imunologia e Imunologia Aplicada

Palavras-chave: leishmaniose tegumentar americana, cinamaldeído, *Leishmania*.

Resumo:

Este estudo investigou a atividade do cinamaldeído sobre macrófagos J774. A1 infectados com L. (L.) amazonensis e avaliou a produção de óxido nítrico (NO), visando o seu uso como uma nova estratégia para o tratamento das leishmanioses. Macrófagos J774. A1 infectados L. (L.) amazonensis (10 promastigotas por macrófago) foram tratados com cinamaldeído a 37°C e 5% CO₂ por 24 horas. Após, o sobrenadante foi coletado para dosagem de NO e as lamínulas foram coradas com Giemsa para avaliação por microscopia. Macrófagos J774. A1 não infectados foram tratados com cinamaldeído por 24 e 48 horas e o NO foi determinado. Em todas as concentrações de cinamaldeído testadas (1000 µM até 31,25 µM) em macrófagos não infectados e em infectados foi verificada uma queda da produção de NO. A % de inibição da infecção em macrófagos infectados tratados com cinamaldeído nas concentrações de 400µM e 200 µM em relação ao controle infectado não tratado foi de 53,40% e 22,12% respectivamente. Sendo assim, podemos concluir que o cinamaldeído possui efeito leishmanicida sobre as formas amastigotas de L. (L.) amazonensis e potencial efeito anti-inflamatório.

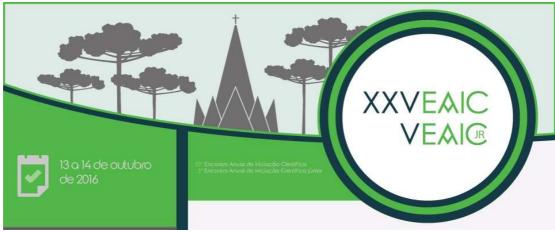
Introdução











A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa e de evolução crônica, considerada uma das seis doenças infecciosas mais importantes do mundo. O tratamento de primeira escolha é baseado em antimoniais pentavalentes. O tratamento é longo (30 dias) e por via parenteral. Como segunda opção há anfotericina B e a pentamidina. Esses medicamentos possuem elevada toxicidade e média eficácia que levam à necessidade de interrupção do tratamento, ou a desistência por parte do paciente.

Dessa forma, o cinamaldeído vem sendo estudado e apresenta atividade antifúngica (LORENZETTI, 2011), atividade antibacteriana (BURU, 2014), anti-inflamatória (MUHAMMAD, et al, 2014) e anti-diabética (MING-YAN, et al, 2015).

Materiais e métodos

Cultivo de Parasitos

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas em meio de cultura 199 suplementado com soro bovino fetal, penicilina G e sulfato de estreptomicina a 25°C e pH 7,2. Os parasitos foram mantidos por subcultivos periódicos.

Cultivo de Macrófagos J774 A.1

Macrófagos J774.A1 foram cultivados em meio RPMI 1640 suplementado com soro bovino fetal, penicilina G estreptomicina. As células foram mantidas por cultivos periódicos.

Atividade sobre formas amastigotas de L. (L.) amazonensis

Macrófagos J774.A1 foram distribuídos em placas de 24 poços (5 x 10⁵ células/poço) contendo lamínulas de vidro. Após 1 hora de incubação as células foram lavadas e infectadas com *L. (L.) amazonensis* (10 promastigotas por macrófago). Após 4 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% CO₂ os poços foram lavados novamente e em seguida o cinamaldeído foi adicionado. Após 24 horas de exposição, o sobrenadante foi coletado para dosagem de óxido nítrico. As lamínulas foram removidas, fixadas em metanol e coradas com Giemsa. Posteriormente foram avaliadas por microscopia de luz por meio de contagens para determinação do percentual de macrófagos infectados e número médio de parasitos por macrófago.

Determinação da produção de óxido nítrico

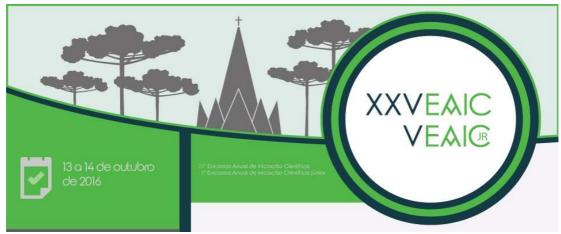
O óxido nítrico foi medido indiretamente pela determinação de nitritos no sobrenadante dos experimentos das culturas e foram incubadas com reagente de Griess. A absorbância foi determinada em espectrofotômetro a











530 nm. A concentração de nitrito foi calculada com base numa curva de nitrito de sódio (5, 10, 30 e 60µM).

Resultados e Discussão

A produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos J774.A1 não infectados tratados com cinamaldeído (1000 μ M até 31,25 μ M) após 24 horas de incubação variou de 0 μ M a 2,14 μ M. A variação no controle foi de 2,43 μ M a 3,59 μ M. Após 48 horas de incubação, a dosagem de NO variou de 0 μ M a 1,38 μ M. Em macrófagos que não receberam nenhum tratamento, essa variação foi de 2,08 μ M a 2,95 μ M. Portanto, em todas as concentrações de cinamaldeído testadas foi verificada uma queda da produção de NO em relação aos controles não tratados.

Ao avaliarmos a % de inibição da infecção em macrófagos infectados com *L.* (*L.*) amazonensis tratados com cinamaldeído (400μM e 200μM) em relação ao controle infectado não tratado, obtivemos 53,40% e 22,12% respectivamente. Por sua vez, a produção de NO por macrófagos infectados e tratados com cinamaldeído após 24 horas de incubação variou de 0,00058 a 0,00193 μΜ. Nos controles a variação foi de 0 a 0,00267 μΜ.

Observamos que o cinamaldeído demonstrou atividade leshmanicida sobre as formas promastigotas de L. (L.) amazonensis com IC50 aproximadamente 212 µM em estudos anteriores e que essa mesma concentração também possui atividade leishmanicida sobre as formas amastigotas. Além disso, a produção de óxido nítrico tanto por macrófagos não infectados como nos infectados foi inferior se comparado aos seus respectivos controles, o que sugere um potencial anti-inflamatório do cinamaldeído, exceto na concentração de 400 µM quando a avaliamos em macrófagos infectados, na qual há elevação da produção de óxido nítrico em relação ao controle. Tal resultado sugere que a partir desta concentração o óxido nítrico passa a auxiliar no processo de morte do parasito, o que não ocorre em concentrações menores como a da IC50 (200 µM), na qual provavelmente o parasito é eliminado por outros mecanismos de ação que não a via do óxido nítrico, tais como reativos de nitrogênio, produção de citocinas e enzimas com ação microbicida, ou até mesmo atuar diretamente sobre o parasito por mecanismos ainda desconhecidos (COIMBRA, et al, 2013).

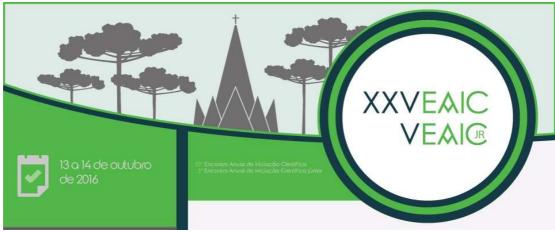
Conclusões











O cinamaldeído demonstrou atividade leishmanicida sobre as formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis*, além de sugerir um potencial efeito antiinflamatório, já que houve uma redução significativa na produção de óxido
nítrico tanto em macrófagos J774.A1 infectados quanto nos não infectados.
Tendo em vista a boa atividade leishmanicida encontrada no cinamaldeído,
novos estudos devem ser realizados a fim de determinar o seu provável
mecanismo de ação leishmanicida.

Agradecimentos

Agradeço ao CNPq pela bolsa PIBIC, a professora Thaís Silveira pela orientação e a todos do Laboratório de Imunologia Clínica da UEM.

Referências

BURU, A. S.; et al. In vitro antibacterial effects of Cinnamomum extracts on common bacteria found in wound infections with emphasis on methicillin-resistant Staphylococcus aureus. **Journal of Enthnopharmacology**, 2014.

COIMBRA, E.S., Antinarelli, L. M. R, Silva, A. D., Bispo, M. L. F, Kaise, C. R, Souza, M. V. N. 7-chloro-4-quinolinylhydrazones: a promising and potent class of antileishmanial compounds. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 81, p. 658-665, 2013.

LORENZETTI, E.R., et al. Bioatividade de óleos essenciais no controle de Botrytis cinérea isolado de morangueiro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.13, 2011.

YAN, Y. –M., et al. Anti-diabetic nephropathy compounds of Cinnamomum cassia. **Journal of Enthnopharmacology**, 2015.

MUHAMMAD, J. S, et al. Anti-inflammatory Effect of Cinnamaldehyde in Helicobacter pylori Induced Gastric Inflammation. **Biological and Pharmaceutical Bulletin,** vol. 38, no. 1, p. 109-115, 2015.







