

ALTERAÇÕES ULTRAESTRUTURAIS E MORFOLÓGICAS EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis* APÓS TRATAMENTO COM O CINAMALDEÍDO

Nathália Martins Franzoi (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Aline Ávila Brustolin, Thaís Gomes Verzignassi Silveira, e-mail: naty_franzoi@hotmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/
Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Imunologia e Imunologia Aplicada.

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

Resumo

Este estudo investigou alterações ultraestruturais de formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* após tratamento com cinamaldeído. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^7 /mL) foram tratadas com a cinamaldeído e posteriormente analisadas quanto às alterações morfológicas nos parasitos, por microscopia óptica comum, após 0, 4, 6, 8, 24, 48, 72 e 96 h de tratamento e alterações nucleares, após 24 h de tratamento, por microscopia de fluorescência. Alterações indicativas de apoptose foram encontradas, como: encolhimento celular, células multiflageladas, granulações intracelulares, forma arredondada, fragilidade de membrana, perda da motilidade e condensação da cromatina nuclear. Novos estudos devem ser realizados a fim de confirmar o mecanismo de ação leishmanicida do cinamaldeído.

Introdução

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas, consideradas um grande problema de saúde pública. São causadas por diferentes espécies de protozoários de *Leishmania*, e acometem 1 a 1,5 milhões de milhões de pessoas/ano.

O tratamento é longo (30 dias), com antimoniais pentavalentes, por via endovenosa, podendo causar efeitos colaterais graves e desconforto ao paciente, proporcionando altos índices de desistência terapêutica, recidiva da doença, e resistência ao parasito. O cinamaldeído demonstra diversas atividades antimicrobianas como: atividade antibacteriana (BURU, et al, 2014), antifúngica (LORENZETTI, 2011) e indícios de apoptose em células cancerígenas humanas (CHANG, 2016). Além da sua atividade leishmanicida para *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (estudos anteriores ainda não publicados). Neste contexto, é interessante investigar o mecanismo de ação do cinamaldeído, visando seu uso como tratamento para leishmanioses.

Materiais e métodos

1. *Cultivo de parasitos*

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

2. *Morfologia celular*

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^7 /mL) foram incubadas com cinamaldeído (200 μ M) por 0, 4, 6, 8, 24, 48, 72 e 96 h. Foi realizado o mesmo procedimento para controle não tratado. As observações foram realizadas em microscópio Fluid Cell Imaging Station (Molecular Probes Life Technology, Carlsbad, CA, USA).

3. *Morfologia nuclear*

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^7 /mL) foram tratadas com o cinamaldeído (200 μ M) e após 24h de incubação, foram fixadas com paraformaldeído a 4% durante 10 min, permeabilizadas com 0,2% de Triton X-100 durante 1 min, e coradas com iodeto de propídio (10 mg/mL) durante 2 min. Foi realizado o mesmo procedimento para controle não tratado. As observações foram realizadas com microscópio de fluorescência Fluid Cell Imaging Station.

Resultados e Discussão

Com este estudo investigamos qual o provável mecanismo de ação leishmanicida do cinamaldeído, já que observações de alterações ultraestruturais e morfológicas são utilizadas para definir mecanismos de ação de novos compostos e identificar o modo de morte celular.

Observamos que o cinamaldeído promoveu alterações morfológicas celulares importantes em todos os tempos de incubação, principalmente entre 4 e 72 horas, como o aparecimento de granulações no interior dos parasitos, células multiflageladas, fragilidade de membrana, forma arredondada e encolhimento celular (Figura 1). Ainda foi possível observar que os parasitos se acumulavam devido a perda de motilidade, tal fato, muito provavelmente deva estar envolvido com o mecanismo de ação leishmanicida dessa droga, já que mudanças na motilidade refletem alterações no metabolismo das células. Essas alterações são sugestivas de apoptose (PROTO et al., 2013).

Em 96 horas de incubação os parasitos recuperaram a motilidade e formato tradicional (Figura 1), o que pode ser justificado pelo baixo tempo de meia-vida do cinamaldeído (JI, 2015) e por termos avaliado a concentração inibitória para 50% dos parasitos (IC_{50}), fazendo com que os parasitos sobreviventes se multiplicassem e assumissem sua formação original.

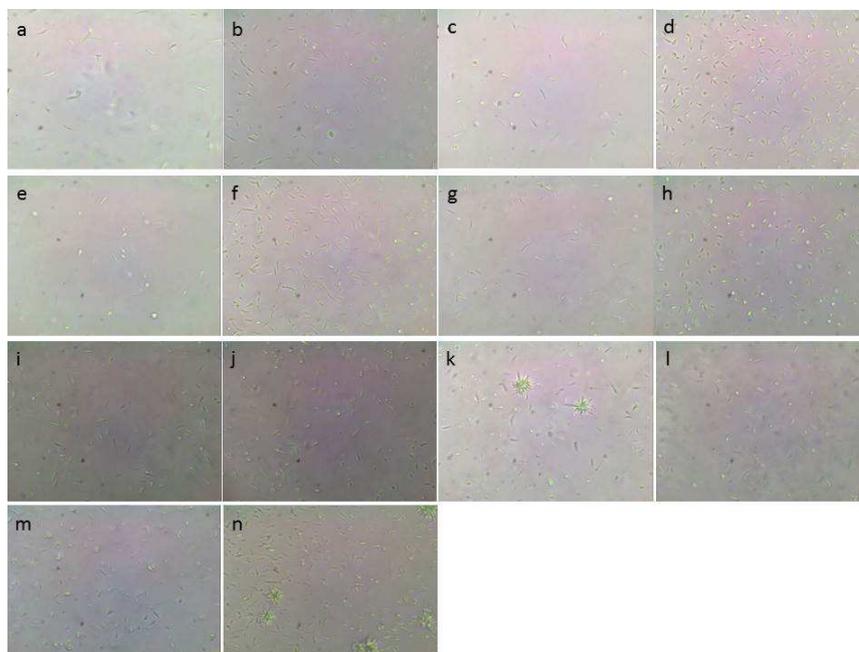


Figura 1: Morfologia Celular das promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com cinamaldeído. Parasitos não tratados (a, c, e, g, i, k, m) e tratados (b, d, f, h, j, l, n) com 0 h, 4 h, 8 h, 24 h, 48 h, 72 h e 96 h, respectivamente.

Também foi possível observar que o cinamaldeído promoveu alterações na morfologia nuclear, como diminuição do núcleo e condensação da cromatina (Figura 2), sugestivas de processos apoptóticos (PROTO et al., 2013).

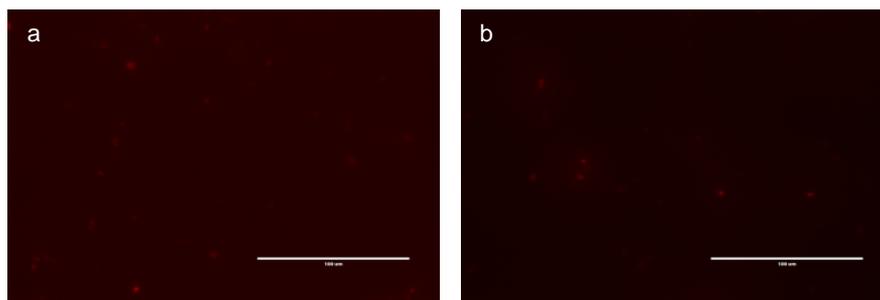


Figura 2. Morfologia nuclear, coloração com iodeto de propídio. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* não tratadas (a) e tratadas com cinamaldeído por 24h (b).

É esperado que os resultados encontrados na morfologia celular e nuclear sejam confirmados com os resultados da microscopia eletrônica de transmissão e que novas alterações ultraestruturais sejam observadas a fim de confirmar o provável mecanismo de ação leishmanicida do cinamaldeído.

Conclusões

O cinamaldeído promoveu alterações morfológicas e estruturais importantes nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Sendo assim, novos estudos *in vitro* são importantes para a confirmação do provável mecanismo de ação leishmanicida do cinamaldeído, visando o seu uso para o tratamento das leishmanioses.

Agradecimentos

Obrigada ao CNPq a professora Thaís Silveira pela orientação e a todos do Laboratório de Imunologia Clínica (IC) – UEM.

Referências

1. BURU, A. S.; et al. ***In vitro antibacterial effects of Cinnamomum extracts on common bacteria found in wound infections with emphasis on methicillin-resistant *Stap.hylococcus aureus****, 2014.
2. CHANG, W.; et al. ***Cinnamomum cassia Essential Oil and Its Major Constituent Cinnamaldehyde Induced Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Human Oral Squamous Cell Carcinoma HSC-3 Cells***, 2016.
3. LORENZETTI, E.R., et al. ***Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinérea* isolado de morangueiro***, 2011. <http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v13nspe/a19v13nspe.pdf>. Acesso em: 23 jul, 18:00.
4. JI, B.; et al. ***Simultaneous determination of cinnamaldehyde, cinnamic acid, and 2-methoxy cinnamic acid in rat whole blood after oral administration of volatile oil of *Cinnamomum ramulus* by UHPLC-MS/MS: An application for a pharmacokinetic study***, 2015.
5. PROTO, W.R., COOMBS, G.H., MOTTRAM, J. C. ***Cell Death in parasitic protozoa: regulated or incidental?*** Nat. Rev. Microbiol, 2013.