ATIVIDADE IMUNOMODULADORA DE 6,7-DEHIDROROILEANONA DERIVADO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *TETRADENIA RIPARIA* NA PRESENÇA E AUSÊNCIA DE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS*

Pollyanna Rina Ferreira da Silva (PIC/UEM), Thaís Gomes Verzignassi Silveira (Orientador), Izabel Galhardo Demarchi (Co-orientador), e-mail: pollyannarinaa@gmail.com.

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

Ciências da Saúde: Farmácia.

Palavras-chave: Leishmaniose, citocinas, diterpeno.

Resumo:

A leishmaniose tegumentar é uma doença infecciosa causada por protozoários *Leishmania* e caracterizada por lesões cutâneas e mucosas. Os antimoniais e a anfotericina B são fármacos utilizados no tratamento da doença, mas estão relacionados com graves efeitos adversos, toxicidade, além de falhas terapêuticas e abandono do tratamento. Por isso, muitos estudos têm sido conduzidos para a descoberta de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose. Recentemente, foi demonstrado o potencial leishmanicida do óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) e seu derivado 6,7-dehidroroileanona (TrROY) sobre promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. No presente estudo, foi avaliada a modulação de citocinas produzidas por macrófagos murinos infectados e não infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com TrROY. O TrROY foi testado nas concentrações de 100, 1 e 0,1 µg/mL após um período de 24 h de incubação, na presença e ausência de infecção por *Leishmania.* A detecção de citocinas (pg/mL) foi realizada por citometria de fluxo utilizando a tecnologia *multiplex*. Os resultados foram analisados utilizando o teste *t* de Student aceitando um intervalo de confiança de 95%. O TrROY foi capaz de modular a produção de citocinas essenciais para a defesa imune contra a leishmaniose, inibindo IL-4 e induzindo IL-12, tanto na presença e ausência de infecção. A concentração de TrROY recomendada para os próximos estudos, é a de 0,1 µg/mL, por ter atividade leishmanicida, mas não citotóxica, e ainda modular a resposta imune de macrófagos murinos infectados por *Leishmania*. Dessa forma, o TrROY mostrou-se como um promissor agente leishmanicida e imunomodulador.

Introdução

A Leishmaniose tegumentar é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, e é caracterizada por lesões cutâneas, mucocutâneas e mucosas. Desde 1940, a leishmaniose tem sido tratada com antimoniais, mas essa terapia apresenta falhas, efeitos adversos graves, e a cardiotoxicidade é frequentemente relatada (Oliveira et al., 2014). Por estas razões, pesquisadores têm investigado produtos naturais para a descoberta de novas estratégias terapêuticas para a leishmaniose. A utilização de plantas medicinais pode ser uma estratégia para a modulação da secreção de citocinas, oferecendo novas abordagens para o tratamento da doença (Demarchi et al, 2015, 2016).

Gazim et al. (2010, 2014) identificaram uma série de compostos da classe dos terpenóides no óleo essencial de *T. riparia* (TrEO), entre os quais está o diterpeno 6,7-dehidroroileanona (*T. riparia* 6,7-dehidroroileanona, TrROY). A atividade antioxidante e antitérmica do TrROY foi recentemente descrita na literatura (Gazim et al. 2014), mas até o presente momento, não há estudos que descrevem os efeitos do TrROY sobre a modulação de citocinas importantes para a resposta imune e eliminação dos parasitos *Leishmania*. Dessa forma, as pesquisas com esse diterpeno têm sido estimuladas para a descoberta de um novo agente leishmanicida. O objetivo deste estudo é avaliar a atividade imunomoduladora do 6,7-dehidroroileanona, TrROY, em macrófagos infectados por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e na ausência de infecção.

Materiais e métodos

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (30 a 40 dias de idade) foram obtidos, e uma suspensão de $1x10^6$ células foram plaqueadas em meio de cultura RPMI e submetidas às seguintes condições: 1) Macrófagos não tratados, cultivado em meio (controle negativo; 2) Macrófagos foram infectados por formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* na proporção de 6 parasitos para cada macrófago (controle positivo de infecção) durante 4 horas; 3) Macrófagos infectados com *Leishmania* (1:6) e tratados com o TrROY nas concentrações de 100, 1 e 0,1 µg/mL, tratamento de 24 h; 4) Macrófagos não infectados e tratados com o TrROY nas concentrações de 100, 1 e 0,1 µg/mL por 24 h. Nessas concentrações, o TrROY possui atividade leishmanicida sobre formas amastigotas de *Leishmania*, e é capaz de reduzir em 50% o índice de infecção de macrófagos murinos infectados por *L. (L.) amazonensis* após 24 h de incubação (Demarchi et al., 2015). Para a determinação das citocinas (pg/mL) utilizou-se o kit *Multiplex Mouse Cytokine Magnetic 10-Plex Panel* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A análise final foi realizada por citometria de fluxo usando a tecnologia Luminex® 200™. Os resultados foram digitados no software Microsoft Excel® 7.0 e a partir do teste *t* de Student foi analisada a significância estatística utilizando um intervalo de confiança de 95%. Para este estudo, foi obtido o parecer favorável do Comitê de Conduta

Ética no Uso de Animais em Experimentações (CEAE) da UEM (parecer 133/2012 e 079/2012).

Resultados e Discussão

Os macrófagos infectados e não tratados com TrROY mostraram uma redução no níveis de IFN-γ e aumento de IL-4. A infecção por *L. (L.) amazonensis* induz a liberação de citocinas IL-10, IL-4 e IL-5 envolvidas com a resposta imune do tipo T_H2, considerada não protetora e diretamente relacionada com a progressão da doença, e reduz citocinas como IFN-γ e IL-12 para escape da resposta imune celular protetora (Oliveira *et al.*, 2014).

Os macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com TrROY somente apresentaram diferença na produção de IFN-γ, IL-12 e IL-4. Ocorreu uma diminuição da produção de IFN-γ em comparação com o controle negativo, no entanto, a infecção por *L. (L.) amazonensis* na ausência de tratamento também foi capaz de diminuir a produção desta citocina, não havendo diferença entre tratado e não tratado. A diminuição do IFN-γ provavelmente ocorreu devido a infecção parasitária e o tratamento com o TrROY não foi capaz de subverter essa ação. Houve um aumento da produção de IL-12. Esta citocina promove a imunidade mediada por células, estimulando os linfócitos TH_1 e controlando a inflamação. Tanto IFN-γ quanto a IL-12 são críticas para o controle da difusão dos agente infecciosos intracelulares como a *Leishmania*, e podem ser alvos para a terapia da leishmaniose (Oliveira, *et al.*, 2014).

Na concentração não citotóxica para macrófagos murinos (0,1 µg/mL), o TrROY promoveu uma redução de IL-4 em relação aos macrófagos infectados e não infectados. Nas demais concentrações de TrROY (100 e 1 µg/mL) em macrófagos infectados também houve redução dos níveis de IL-4. Nessas mesmas condições, foi observado que nessas concentrações, o TrROY apresenta citotoxicidade, por isso sugere-se que esse efeito de redução desta citocina esteja relacionado com a citotoxicidade promovida pelo diterpeno quando utilizado nestas concentrações (Demarchi et al., 2015). A 0,1 µg/mL, o TrROY foi capaz de subverter o aumento de IL-4 promovido pela infecção por *Leishmania*, reduzindo seus níveis significativamente. Isto é favorável para o tratamento, uma vez que a IL-4 promove uma regulação negativa da resposta imune e também estimula a resposta celular do tipo TH_2 inibindo os mecanismos de morte induzidos por macrófagos, e promovendo a progressão da infecção (Oliveira, *et al.*, 2014). Com a inibição da IL-4, as células TH_2 e TH_{17} são inibidas, e citocinas de proteção são estimuladas pelo diterpeno, como IL-12, contribuindo, assim, para a morte de *Leishmania* e controle da infecção.

Conclusões

O TrROY foi capaz de modular a produção de citocinas essenciais para a defesa imune contra a leishmaniose, inibindo IL-4 e induzindo IL-12. A partir deste estudo, o diterpeno 6,7-dehidroileanona derivado do óleo essencial de *T. riparia* tem atividade imunomoduladora *in vitro* na presença e ausência de infecção por *Leishmania.* Por isso, sugere-se que sejam realizados testes *in vivo* com o TrROY para esclarecer o seu potencial leishmanicida e imunomodulador.

Agradecimentos

Ao Programa de Iniciação Científica (PIC-UEM) e ao Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina (DAB).

Referências

DEMARCHI, I. G.; THOMAZELLA, M. V.; TERRON, M. S.; LOPES, L.; GAZIM, Z. C.; CORTEZ, D. A. G.; DONATTI, L.; ARISTIDES, S.M.A; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. Antileishmanial activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from *Tetradenia riparia*. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 128-137, 2015.

DEMARCHI, I. G.; TERRON, M. S.; THOMAZELLA, M. V; MOTA, C. A.; GAZIM, Z. C.; CORTEZ, D. A. G. ; ARISTIDES, S. M. A. ; SILVEIRA, T. G. V.; LONARDONI, M. V. C. Antileishmanial and immunomodulatory effects of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd. **Parasite Immunology (Print)**, v. 38, p. 64-77, 2016.

GAZIM, Z. C.; AMORIM, A.C.; HOVELL, A.M.; REZENDE, C.M.; NASCIMENTO, I.A.; FERREIRA, G.A.; CORTEZ, D.A.G. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in southern Brazil. **Molecules**, v.15**,** n.8, p.5509-5524, 2010.

GAZIM, Z.C.; RODRIGUES, F.; AMORIN, A.C.; DE REZENDE, C.M.; SOKOVIC, M.; TESEVIC, V.; VUCKOVIC, I.; KRSTIC, G.; CORTEZ, L. E.; COLAUTO, N. B.; LINDE, G.A.; CORTEZ, D.A.G. New natural diterpene-type abietane from *Tetradenia riparia* essential oil with cytotoxic and antioxidant activities. **Molecules**, v.19**,** n.1, p.514-524, 2014.

OLIVEIRA, W.N.; RIBEIRO, L.E.; SCHRIEFFER, A.; MACHADO, P.; CARVALHO, E.M.; BACELLAR, O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v.66**,** n.2, p.127-132, 2014.