

AValiação da Atividade Biológica e Mecanismo de Ação do Composto Sintético (E)-2-([2,2'-bitiofen]-5-il-metileno)hidrazinocarbotioamida em Formas Promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Andressa Fumagalli Dacome (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Helito Volpato, Celso Vataru Nakamura (Co-orientador), Sueli Oliveira Silva Lautenschlager (Orientadora)

e-mail: andressa.fumagalli@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde,
Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e
Cosméticos, Maringá, PR.

Área: Parasitologia

Subárea: Protozoologia Parasitária Humana

Palavras-chave: Leishmaniose, *Leishmania* sp e tiofeno.

Resumo: A Leishmaniose é um problema de saúde pública, sendo considerada endêmica em diversos países. Seu tratamento muitas vezes não é eficaz, visto que os medicamentos disponíveis apresentam alta toxicidade, difícil administração e podem induzir resistência. Dessa forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade do composto sintético (E)-2-([2,2'-bitiofen]-5-il-metileno) hidrazinocarbotioamida (**B-TIOSSIEMI**) frente a *Leishmania amazonensis* e macrófagos (J774A1), obtendo-se CI_{50} e CC_{50} de 5 μ M e 365 μ M (IS: 73), respectivamente. Também analisou a ultraestrutura do parasito, constatando alterações no cinetoplasto, presença de estruturas concêntricas de membrana, presença de vacúolos e inclusões lipídicas. Essas alterações podem estar relacionadas com o aumento dos níveis de ROS. A partir dos resultados finais, considerou-se que o composto **B-TIOSSEMI** pode ser considerado uma alternativa para o tratamento de pacientes com leishmaniose.

Introdução

As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo predominante em 88 países, incluindo o Brasil. Estima-se que aproximadamente 12 milhões de pessoas estão afetadas em todo o mundo, e que ocorra 1,3 milhões de novos casos anualmente ("WHO | Leishmaniasis", 2016). O tratamento de pacientes com leishmaniose é baseado em antimoniais pentavalentes, anfotericina B e miltefosina. Infelizmente, os atuais fármacos apresentam alto índice de toxicidade e alguns casos de resistência (BERMAN, 1997). Diante dessas dificuldades apresentadas pelo atual tratamento de pacientes com leishmaniose, estudos com substâncias naturais e sintéticas têm sido considerado um importante via no desenvolvimento de novos fármacos.

Recentemente, estudos realizados por Takahashi demonstraram promissora atividade de compostos isolados de *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass, podendo essa atividade estar relacionada com a presença do grupo tiofeno em suas estruturas químicas (TAKAHASHI et al., 2011; TAKAHASHI; BRITTA, 2013). Sendo assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade biológica e mecanismo de ação do composto derivado tiofênico sintético E)-2-([2,2'-bitiofen]-5il-metileno) hidrazinocarbotioamida (**B-TIOSSEMI**) frente formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Materiais e métodos

Para avaliar atividade biológica, formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 parasitos/mL) foram tratadas com diferentes concentrações do **B-TIOSSEMI** por 72 h. Após o tratamento, foi realizada a contagem dos parasitos em câmara de Neubauer para determinar a concentração inibitória de 50% dos parasitos (CI_{50}). Para avaliar a citotoxicidade, macrófagos da linhagem J774A1 (5×10^5 células/mL) foram tratados com diferentes concentrações do **B-TIOSSEMI** por 48 h. Em seguida, as células foram incubadas na presença de MTT por 4 h, adicionado DMSO e realizado leitura em espectrofotômetro de placa (470 nm) com objetivo de determinar a concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}). Com intuito de elucidar possível mecanismo de ação do composto em formas promastigotas, foram realizadas metodologias para análise de alterações ultraestruturais e bioquímicas. Para avaliar alterações ultraestruturais, formas promastigotas (1×10^6 parasitos/mL) foram tratadas com **B-TIOSSEMI** por 24 h, e em seguida processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Para isso, após o tratamento, os parasitos foram lavados com PBS, fixados com glutaraldeído 2,5%, lavados em tampão cacodilato 0,1 M, pós-fixado com tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8%, desidratados em acetona, incluídas em resina EPON, realizado corte ultrafinos, contrastado com acetato de uranila 5% e citrato de chumbo, e visualizado em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JM 1400. Para análise de alterações bioquímicas no parasito, foi realizada metodologias por espectrofluorescência. Para isso, formas promastigotas (1×10^6 parasitos/mL) foram tratadas com **B-TIOSSEMI** por 24 h, e em seguida os parasitos foram lavados com PBS e marcados com iodeto de propídio, H_2DCFDA e Vermelho do Nilo para avaliar a integridade da membrana plasmática, níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e inclusões lipídicas, respectivamente.

Resultados e Discussão

O composto sintético **B-TIOSSEMI** demonstrou atividade promissora frente as formas promastigotas de *L. amazonensis*, demonstrando um CI_{50} de 5 μM . Em macrófagos J774A1 o composto resultou no CC_{50} de 365 μM , demonstrando um índice de seletividade maior para os parasitos (IS: 73). Através de microscopia eletrônica de transmissão foi possível encontrar alterações ultraestruturais nos parasitos tratados com o composto, como por exemplo, alteração no cinetoplasto, presença de estruturas concêntricas de

membrana, presença de vacúolos e inclusões lipídicas. Foi possível verificar também, por metodologias fluorimétricas, que o composto **B-TIOSSEMI** induziu aumento dos níveis de ERO, aumento de inclusões lipídicas e alterações na integridade de membrana plasmática em formas promastigotas tratadas por 24 h. O estresse oxidativo é caracterizado por uma alteração no metabolismo redox, podendo estar relacionado com o aumento dos níveis de ERO e/ou diminuição do sistema antioxidante da célula. Desta forma, as ERO podem provocar danos celulares que culmina na morte celular, como por exemplo, alteração em lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. No presente trabalho, foi possível verificar que o composto **B-TIOSSEMI** provocou alteração na integridade da membrana plasmática, inchaço mitocondrial e aumento de inclusões lipídicas, podendo ser explicado pelo aumento dos níveis de ERO.

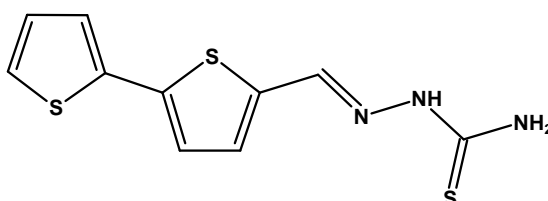


Figura 01. Estrutura química do composto E)-2-([2,2'-bitiofen]-5il-metileno)hidrazinocarbotioamida (**B-TIOSSEMI**). C₁₀H₉N₃S₃, MM: 267,00.

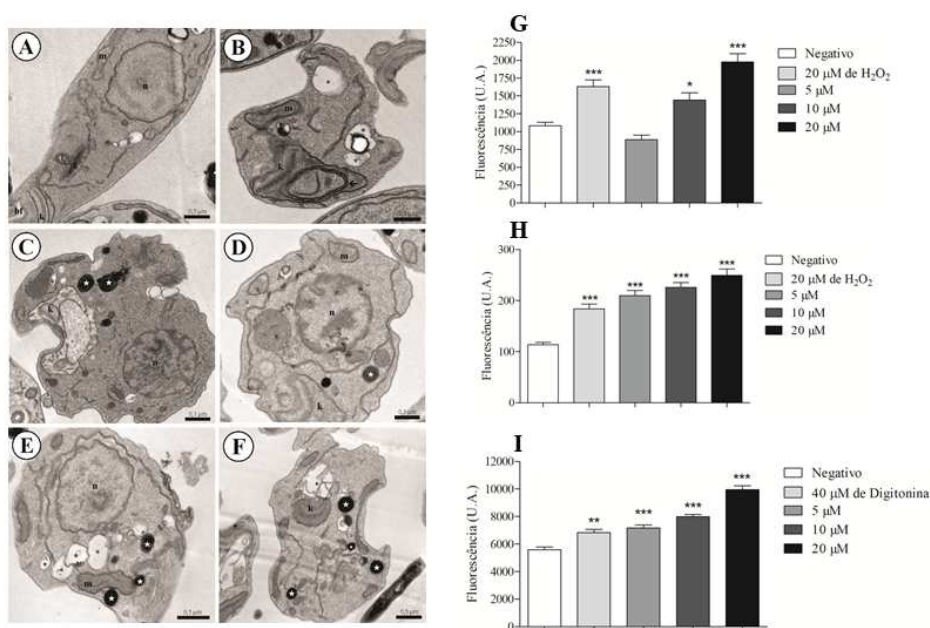


Figura 02 – (A-F). Análise ultraestrutural por microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas tratadas com **B-TIOSSEMI**: **(A)** controle não tratado, **(B-D)** tratado com 5 μM e **(E-F)** tratado com 10 μM. **(G)** Espécies reativas de oxigênio, **(H)** Inclusões lipídicas e **(I)** Integridade de membrana plasmática por espectrofluorímetro. **(n)** núcleo, **(m)** mitocôndria, **(k)** cinetoplasto, **(g)** complexo de Golgi, **(bf)** bolsa flagelar, asteriscos: vacúolos, e estrela branca: inclusões lipídicas.

Conclusões

O composto **B-TIOSSEMI**, apresentou resultados satisfatórios frente aos estudos realizados em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Como analisado, aumento da produção de ERO pode ser o fator desencadeante para alterações ultraestruturais causadas no parasito, levando a morte celular. Além disso, a seletividade da droga frente ao parasito permite afirmar que o composto apresenta uma segurança maior às células dos mamíferos, diminuindo sua toxicidade. Dessa forma o composto sintético **B-TIOSSEMI** pode ser uma alternativa para o tratamento de pacientes com leishmaniose. No entanto, mais estudos são necessários para comprovação de seu segurança e elucidação mais precisa do mecanismo de ação.

Agradecimentos

Universidade Estadual de Maringá, Fundação Araucária, CAPES e CNPq.

Referências

- BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 24, n. 4, p. 684–703, abr. 1997.
- LEE, S. J., ZHANG, J., CHOI, A. M. K., KIM, H. P. Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 327, p. 1–10, 2013.
- TAKAHASHI, H. T. et al. Thiophene derivatives with antileishmanial activity isolated from aerial parts of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass. **Molecules**, v. 16, n. 5, p. 3469–3478, 2011.
- TAKAHASHI, H. T.; BRITTA, E. A. Antileishmanial activity of 5-methyl- from *Porophyllum ruderale* is related to mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. p. 330–333, 2013.
- VOLPATO, H. et al. Mitochondrial dysfunction induced by N-tetrahydro- β - carboline-3-carboxamide is required for cell death of *Trypanosoma cruzi*. **PLOS one**, v. 10, p. 1–11, 2015.
- WHO | Leishmaniasis. **WHO**, 2016.