

INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DO LAPACHOL E β -LAPACHONA (NAFTOQUINONAS)

Bruna Gomes Sydor (PIBIC/CNPq/UEM), Áquila Carolina F. H. R. Milaré (Doutoranda/PCS) Maria Valdrinez Campana Lonardoni (Orientador), e-mail: mvclonardoni@uem.com

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

Área: 4.00.00.00-1 Ciências da Saúde; Subárea: 4.01.01.09-6 Doenças Infecciosas e Parasitárias

Palavras-chave: Leishmaniose, *Leishmania amazonensis*, Naftoquinonas

RESUMO

Entre as doenças infecciosas causadas por protozoários, a leishmaniose é uma das mais frequentes no Brasil. É uma doença infecciosa, não contagiosa causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida ao homem pela picada de insetos flebotomíneos fêmea do gênero *Lutzomya*. A leishmaniose tegumentar (LT) é a forma clínica mais comum no Brasil, com o desenvolvimento de lesões únicas ou múltiplas no local da picada do inseto. O tratamento é realizado com antimoniais pentavalentes (N-metilglucamina), anfotericina B e pentamidinas, porém, os efeitos colaterais são frequentes devido à alta toxicidade. O desenvolvimento de novos fármacos, seguros, eficazes e de baixo custo se faz necessário para o tratamento da LT. Estudos com quinonas, substâncias orgânicas presentes na natureza, mostram que estes compostos tem inúmeras atividades farmacológicas. O lapachol, extraído da casca do Ipê e a β -lapachona, isômero do lapachol, são derivados das naftoquinonas, com atividade anti-*Leishmania*. Porém, dados sobre a atividade desses compostos em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* são escassos. Neste trabalho, com auxílio de técnicas de análise de morfologia celular e nuclear, permeabilidade de membrana e fragmentação do DNA, sugere-se que o mecanismo de morte induzido por lapachol e β -lapachona em *Leishmania* tem características dos processos de morte celular por apoptose.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidas ao homem por meio da picada do flebotomíneo fêmea do gênero *Lutzomya*. O protozoário alterna seu ciclo de vida em dois tipos morfológicos: promastigota e amastigota [1]. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) a doença pode se manifestar como leishmaniose cutânea, visceral ou mucocutânea [2]. A leishmaniose tegumentar (LT) é a mais frequente e sua principal manifestação clínica é o

desenvolvimento de uma lesão ulcerada no local da picada. Essa lesão pode ser única e restrita a um sítio corporal, ou ainda pode se disseminar.

O tratamento é realizado com antimoniais pentavalentes (N-metilglucamina), anfotericina B e pentamidinas. Estes medicamentos causam inúmeros efeitos colaterais devido à alta toxicidade, tem elevado custo, difícil administração e podem induzir resistência.

Nos últimos anos, estudos com plantas buscam novos fármacos com potencial anti-*Leishmania*. As quinonas são substâncias orgânicas cuja estrutura é composta por dois grupamentos carbonilas e um anel insaturado de seis átomos de carbono. Com base no tipo de sistema aromático que contém o anel, as quinonas são classificadas como benzoquinonas, naftoquinonas, antraquinonas e fenantraquinonas. As naftoquinonas, em especial, apresentam inúmeras atividades farmacológicas, incluindo ação antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antipirética e anticancerígena. O lapachol, pertencente a essa classe de compostos, é extraído da casca do Ipê (*Tabebuia avellaneda*). A partir do lapachol é possível obter o isômero β -lapachona [3].

É crescente o interesse no estudo desses compostos em pesquisas com leishmaniose. Embora existam trabalhos acerca de suas propriedades anti-*Leishmania*, são escassos os estudos sobre os mecanismos de ação do lapachol e β -lapachona em *Leishmania (L.) amazonensis*. Nesse sentido, este estudo pode contribuir com soluções aos problemas referentes aos tratamentos disponíveis, reforçar dados que a literatura científica disponibiliza e embasar novos estudos sobre esta classe de compostos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Compostos

O lapachol foi obtido a partir do Ipê roxo, segundo a metodologia proposta por Barbosa e Neto (2013) [3]. O derivado β -lapachona foi obtido a partir do lapachol, conforme procedimento reportado no mesmo artigo. Ambos os compostos foram fornecidos pelo laboratório de Química da Universidade Estadual de Maringá. O lapachol e a β -lapachona, foram estudados nas concentrações inibitórias para 50% dos parasitos (IC_{50}), 76,62 μ g/mL e 1,63 μ g/mL respectivamente.

Cultura e manutenção de *Leishmania (L.) amazonensis*

Leishmania (L.) amazonensis (MHOM/BR/1977/LTB0016) foi cultivada em meio de cultura 199 (Gibco®), suplementado com soro bovino fetal e antibióticos, a 25°C. As culturas foram mantidas por repiques semanais.

Microscopia Eletrônica de Varredura

Para avaliar alterações morfológicas, formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas com lapachol e β -lapachona em suas concentrações IC_{50} por 24 horas, fixadas em glutaraldeído a 2,5%, desidratadas em uma série de álcoois, submetidas a secagem em ponto crítico em um Bal-Tec CPD-030, metalizado em ouro em um Balzers SCD-

030 para posterior leitura em microscópio eletrônico de varredura EV JSM-6360 LV.

Morfologia celular e nuclear

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^7 parasitos/mL) foram incubadas em diferentes tempos (0, 4, 8, 24, 48 e 72h) com lapachol ou β -lapachona na IC_{50} . As alterações da morfologia celular foram observadas em microscópio EVOS® FL Imaging System. Posteriormente, promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^7 parasitos/mL) foram cultivadas com os compostos em estudo (IC_{50}) por 24h, fixadas com paraformaldeído a 4%, permeabilizadas com Triton X-100, e coradas com iodeto de propídio. A análise da morfologia nuclear foi realizada com o microscópio EVOS® FL Imaging System, conforme descrito por Das, *et. al.* (2001) [4].

Fragmentação de DNA

A metodologia para estudo da fragmentação do DNA foi realizada conforme Mukherjee e cols. [5] com modificações. Para isso, *(L.) amazonensis* (1×10^6 promastigotas/mL) foi tratada com os compostos durante 24h na IC_{50} . Os sedimentos foram ressuspensos em tampão de digestão, ao qual foi adicionado proteinase K com posterior incubação por 3h em banho de gelo. A seguir a extração do DNA foi realizada com fenol e clorofórmio, e o material foi centrifugado. Etanol 70% foi adicionado ao sedimento. Após nova centrifugação o sedimento foi colocado em banho seco, e posteriormente ressuspensos em tampão Tris-EDTA. As alíquotas de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose com brometo de etídio utilizando tampão Tris-acetato-EDTA e fotografado sob luz ultravioleta.

Permeabilidade de Membrana

Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^7 parasitos/mL) foram tratadas com lapachol e β -lapachona nas concentrações do IC_{50} . Após 0, 6, 24, 48 e 72h de incubação, foram tratadas com iodeto de propídio. As observações foram realizadas com um microscópio EVOS® FL Imaging System, com a observação de pelo menos 200 células em cada condição.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

No presente trabalho, formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* foram tratadas com o lapachol e β -lapachona, ambos na concentração inibitória para 50% dos parasitos (IC_{50}), 76,62 μ g/mL e 1,63 μ g/mL, respectivamente. Na avaliação da morfologia celular, foi possível observar que houve uma diferença no grau do dano celular ao longo do tempo (avaliação em 0, 4, 8, 24, 48 e 72h), sendo marcante a perda flagelar, encolhimento citoplasmático e alteração no formato do parasito, comparativamente ao controle não tratado. Alterações no núcleo também foram pesquisadas com o auxílio do marcador nuclear fluorescente. Verificou-se maior condensação da cromatina com relação ao controle não tratado, fato observado também pela emissão de maior intensidade de fluorescência. A análise da permeabilidade da membrana

indicou potencial perda da integridade com maior evidência após 24 horas do contato do parasito com o lapachol e após 48 horas do contato com a β -lapachona. O lapachol e a β -lapachona apresentam comportamentos semelhantes, porém a β -lapachona apresentou melhores resultados no quesito inibição de crescimento de parasitos e aparentemente induziu alterações morfológicas mais acentuadas.

Em concordância com os resultados acima obtidos, os experimentos de fragmentação do DNA mostraram que ambos os compostos apresentaram bandas similares aquelas obtidas com o peróxido de hidrogênio, usado como controle positivo de fragmentação.

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos sugerem que o mecanismo de morte ocasionado pelo lapachol e β -lapachona é semelhantemente aos processos que ocorrem na morte celular por apoptose, um processo de autodestruição reconhecido por gerar retração do tamanho celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA, além da formação de corpos apoptóticos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq por ter possibilitado o financiamento desta pesquisa, a professora Maria Valdrinez C. Lonardoni pela orientação e a todos do Laboratório de Imunologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

- [1] NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Atheneu, 2004.
- [2] World Health Organization. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> Acesso: abril/2017.
- [3] BARBOSA, T.P.; NETO, H.D. Preparação de derivados do lapachol em meio ácido e em meio básico: uma proposta de experimentos para a disciplina de Química Orgânica Experimental. **Química Nova**. 36 (2), p. 331-334, 2013.
- [4] DAS, M., MUKHERJEE, S.B.; SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Cell Science**. 114, 2461-2469, 2001.
- [5] MUKHERJEE, S., LAFAVE, M.C., SEKELSKY, J. DNA damage responses in *Drosophila mutants* with reduced or altered NBS function. **DNA Repair (Amst.)** 8(7): 803-812, 2009.