

AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE À ANFOTERICINA B DE FORMAS AMASTIGOTAS INTRACELULARES DE *Leishmania (Viannia) braziliensis* ISOLADAS DE PACIENTE DA REGIÃO NOROESTE DO PARANÁ

Lucas dos Santos de Souza (PIC/UEM), Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos-Milaré, Aline Ávila Brustolin, Raíssa Bocchi Pedroso, Andrea Claudia Bekner Silva Fernandes (Orientadora).
e-mail: acbsfernandes@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Saúde.

Área e subárea do conhecimento: Imunologia e Imunologia aplicada.

Palavras-chave: Leishmaniose; sensibilidade; Anfotericina B.

Resumo

A leishmaniose tegumentar, doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*, caracteriza-se por apresentar úlceras no local da picada do inseto flebotomíneo. O tratamento disponível atualmente pode provocar efeitos adversos de grande magnitude. Dessa maneira, a avaliação da sensibilidade de formas amastigotas intracelulares de isolados de pacientes, frente à anfotericina B, é de grande importância para a compreensão do mecanismo de ação deste fármaco. Com base nisso, o presente trabalho avaliou a atividade anti-*Leishmania* da anfotericina B em formas amastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* isoladas de um paciente com perfil de sensibilidade ao antimoniato de meglumina (Glucantime®). O número médio de parasitos no interior de macrófagos infectados diminuiu, quando comparado ao controle. A porcentagem de inibição da infecção variou de 46 % ($\pm 3,7$) para 0.3 $\mu\text{g/mL}$ a 67% ($\pm 13,2$) para 0.075 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B. Entre as concentrações estudadas as variações no índice de infecção e na porcentagem de inibição de infecção não foram significativas ($p > 0,05$). A concentração inibitória para 50% dos parasitos (IC_{50}) foi de 0,25 $\mu\text{g/mL}$ e não ocorreu a estimulação da produção de óxido nítrico nas concentrações estudadas. Estes resultados indicam que o isolado IOC-L 3492, sensível ao antimoniato de meglumina, também possui sensibilidade à anfotericina B, não sendo dose dependente para as concentrações testadas.

Introdução

As leishmanioses são doenças infecciosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, de importância mundial por estarem distribuídas em cinco dos seis continentes e serem endêmicas em 98 países. A leishmaniose tegumentar (LT) é a forma mais comum das leishmanioses, caracterizada por lesões ulceradas na pele e mucosas, acarretando marcas permanentes, desfiguração, e debilitação com impactos psicossociais. *Leishmania (Viannia) braziliensis*, é a espécie prevalente no estado do

Paraná, e no Brasil, uma das principais espécies responsáveis por causar a LT (BRASIL, 2017).

O tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde, no Brasil, utiliza o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) como medicamento de primeira escolha, e na ausência de resposta terapêutica ou fatores associados (comorbidades, gravidez, etc), a anfotericina B, é um dos medicamentos de segunda opção (BRASIL, 2017).

Fernandes et al. (2016) caracterizaram, *in vitro*, isolados de pacientes com diferentes perfis de sensibilidade ao antimoniato de meglumina e dentre as características analisadas, diferenças no perfil de infectividade em macrófagos e produção de citocinas, além de aspectos ultraestruturais poderiam contribuir para esta variabilidade.

A avaliação destes mesmos isolados frente ao seu perfil de sensibilidade à anfotericina B é de grande interesse pois, o uso deste fármaco é indicado em regiões com alto índice de resistência aos antimoniais (BERN et al., 2006). A análise do perfil de sensibilidade do isolado IOC-L 3492, considerado sensível ao antimoniato de meglumina, foi o objeto de estudo deste trabalho.

Materiais e métodos

Cultura e manutenção de Leishmania e Cultura de macrófagos J774 A.1

O isolado de *L. (V.) braziliensis* mantido por criopreservação foi reativado em meio de cultura 199 suplementado com soro fetal bovino (SBF) 10% (v/v), 20 mM de L-glutamina e antibióticos (100UI/mL de penicilina e 0,1µg/mL de estreptomomicina). As culturas foram incubadas a 25°C e mantidas por repiques semanais. Os macrófagos (1×10^6 macrófagos/mL) foram cultivados em meio RPMI 1640 pH 7,2 suplementado com 10% de SBF a 37°C e 5% de CO₂ até a obtenção de uma monocamada. Repiques para manutenção da linhagem foram feitos semanalmente.

Perfil de sensibilidade de amastigota intracelular frente à anfotericina B

Uma suspensão de 1×10^6 macrófagos/mL foi cultivada em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas estéreis em meio RPMI 1640 pH 7,2 por 2 h a 37°C e 5% de CO₂. Posteriormente, os macrófagos foram infectados com 6 promastigotas do isolado IOC-L 3492 por 4 h a 37°C e 5% de CO₂. Depois, foram lavados e incubados por 24 h com diferentes concentrações de anfotericina B para avaliação da inibição de crescimento e determinação da concentração inibitória de 50% dos parasitos (IC₅₀). Para tanto, as lâminas foram coradas com kit de coloração panótica (Laborclin, Curitiba, PR, Brasil). Macrófagos não infectados foram utilizados como controle negativo de infecção e macrófagos infectados e não tratados como controle positivo. O número de parasitos foi determinado pela contagem em pelo menos 200 macrófagos, e os resultados foram expressos como índice de infecção (porcentagem de macrófagos infectados pela média de parasitos internalizados por célula). Os experimentos foram feitos em duplicata pelo menos duas vezes.

Dosagem de NO

O óxido nítrico foi medido indiretamente pela determinação de nitritos no sobrenadante dos experimentos com amastigotas pelo método de Griess (GREEN et al. 1982). A leitura foi realizada por espectrofotometria a 450 nm.

Análise estatística

Os resultados foram submetidos à análise estatística no programa BioEstat 5.3, sendo expressos como média \pm erro padrão da média. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do Teste de Tukey. O nível de significância adotado foi de 5%.

Resultados e Discussão

A avaliação do isolado IOC-L 3492, frente ao seu perfil de sensibilidade à anfotericina B é de grande interesse, pois o uso deste fármaco é indicado em regiões com alto índice de resistência aos antimoniais (BERN, et al., 2006). Este isolado apresentou sensibilidade significativa ($p < 0,05$) à anfotericina B com concentração capaz de inibir 50% do crescimento das amastigotas (IC_{50}) de 0,25 $\mu\text{g/mL}$. O valor de IC_{50} para formas promastigotas deste isolado foi de 0,15 $\mu\text{g/mL}$ (Dados não publicados). Mello et al. 2014, descreveram a sensibilidade de *L. braziliensis* (MHOM/BR/1987/M11272), frente a anfotericina B, com um valor de IC_{50} de 4,25 μM para formas promastigotas.

O índice de infecção (IDI - razão entre o número de macrófagos infectados e a média de protozoários por macrófagos) foi significativamente diferente entre o controle não tratado e as diferentes concentrações testadas (Fig. 1A). Para o controle positivo observou-se um IDI de $117 \pm 5,3$ e de $63 \pm 1,41$; $48 \pm 1,43$ e $37 \pm 13,63$ para as concentrações de 0,3 $\mu\text{g/mL}$, 0,15 $\mu\text{g/mL}$ e 0,075 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

A porcentagem de inibição da infecção foi de 46%, 59% e 67% (0,3, 0,15 e 0,075 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente) sem variação significativa entre elas (Fig 1B), inferindo uma atividade independente de dose. Mello et al., 2014 também observou uma porcentagem de inibição relativamente alta, mais de 70% para a concentração de IC_{50} testada.

A anfotericina B não promoveu estimulação na produção de óxido nítrico para macrófagos J774A.1 infectados com o isolado IOC-L 3492 e tratados com as diferentes concentrações testadas, sugerindo que este não é o mecanismo pelo qual este medicamento atua neste isolado.

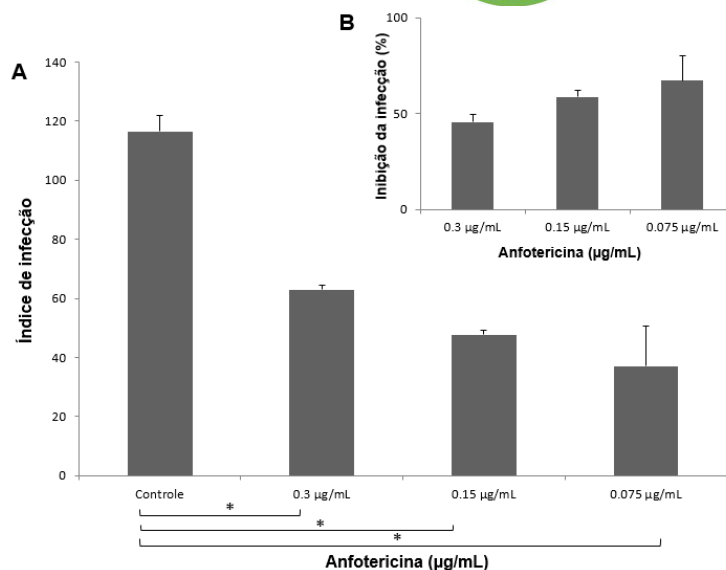


Fig. 1 Atividade da anfotericina B para formas amastigotas do isolado IOC-L 3492. A) Índice de infecção. B) Porcentagem de inibição da infecção. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão. * $p < 0.05$. Todas as concentrações foram testadas em duplicata pelo menos duas vezes.

Conclusões

Estes resultados indicam que o isolado IOC-L 3492, sensível ao antimoníato de meglumina também possui sensibilidade à Anfotericina B, não sendo dose dependente para as concentrações testadas.

Referências

BERN, C., ADLER-MOORE, J., BERENQUER, J., et al. (2006). **Liposomal amphotericin B for the treatment of visceral leishmaniasis**. Clin. Infect. Dis. 43, 917–924.

BRASIL, M. DA SAÚDE (2017). **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde

FERNANDES ACBS, PEDROSO RB, DE MELLO TFP, et al. (2016). **In vitro characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* isolates from patients with different responses to Glucantime® treatment from Northwest Paraná, Brazil**. Exp Parasitol. 167:83–93.

GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, et al. (1982). **Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids**. Anal Biochem 126:131–138.

MELLO TFP, BITENCOURT HR, PEDROSO RB, et al. (2014). **Leishmanicidal activity of synthetic chalcones in *Leishmania (Viannia) braziliensis*** Experimental Parasitology 136, 27–34.