

EFEITOS DO COMPOSTO SINTÉTICO 5'-(3-HYDROXPENT-1-YN-1-YL)-[2,2'- BITHIOPHENE]-5-CARBALDEHYDE SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis*

Rayanne Regina Beltrame Machado (PRONEX/CNPq/FA/UEM), Danielle Lazarin-Bidóia (co-orientador), Celso Vataru Nakamura (Orientador)
Email: cvnakamura@gmail.com

Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos, Departamento de Ciências Básica da Saúde, Universidade Estadual de Maringá (UEM), Maringá, Paraná, Brazil.

Farmácia – Ciências farmacêuticas

Palavras-chave: Leishmaniose, morte celular, atividade antileishmania

Resumo:

Leishmaniose é uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas que contribuem para a manutenção da desigualdade e da pobreza. Consequentemente, o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos é urgentemente necessário. Neste estudo, foi avaliado a atividade antileishmania e a citotoxicidade de várias substâncias sintéticas, bem como o mecanismo de ação da substância mais ativa. A substância **ACOP-1C** se mostrou com um bom potencial, induzindo alterações morfológicas e ultraestruturais em promastigotas de *L. amazonensis*, como ruptura da membrana plasmática e perda do conteúdo celular. Além disso, observou-se, também alterações bioquímicas, como aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e lipoperoxidação. Portanto, **ACOP-1C** promove desequilíbrio na homeostase redox do parasito, acarretando na morte celular de *L. amazonensis*.

Introdução

Leishmanioses são doenças transmitidas por vetores e causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. Amplamente distribuídas, as regiões mais afetadas são geralmente as mais pobres, em países de clima tropical e subtropical. Estima-se que cerca de 1,7 bilhão de indivíduos vivem em risco de infecção. Entre as doenças tropicais negligenciadas, a leishmaniose ocupa a primeira posição em termos de mortalidade (50.000 mortes em 2010) e morbidade [1].

Mosquitos fêmeas pertencentes ao gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* transmitem os protozoários através da circulação sanguínea [2]. A resposta imune gerada durante a infecção por *Leishmania* pode levar à uma resposta inflamatória exacerbada e, consequentemente, a manifestações clínicas da doença, como febre e lesão tecidual, as quais se caracterizam como Leishmaniose visceral e cutânea.

Os atuais tratamentos disponíveis incluem antimoniais pentavalentes, anfotericina B, miltefosina, paramomicina e pentamidina, mas as combinações desses fármacos são normalmente tóxicas para o paciente, mesmo em doses baixas [3] e por isso, há a necessidade de se desenvolver novos agentes terapêuticos para o tratamento de pacientes com Leishmaniose.

Diante disso, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antileishmania de várias substâncias sintéticas e estudar o possível mecanismo de ação em especial, da substância 5'-(3-hydroxypent-1-yn-1-yl)-[2,2'-bithiophene]-5-carbaldehyde (**ACOP-1C**).

Materiais e métodos

Atividade antiproliferativa sobre formas promastigotas de Leishmania amazonensis

O ensaio antiproliferativo foi realizado com um lote de treze substâncias orgânicas sintetizadas pela doutoranda Deysiane Lima Salvador e pela Professora Maria Helena Sarragiotto, do Departamento de Química Orgânica da Universidade Estadual de Maringá. Para avaliação da atividade antiproliferativa das substâncias, foi utilizado o ensaio de XTT. Para isso, promastigotas na concentração de 1×10^6 células/mL foram expostas às substâncias em concentrações crescentes por 72 h em 25 °C.

A absorbância foi lida em espectrofotômetro (BIO-TEK Power WaveXS spectrophotometer) a 450 nm. Os valores de IC_{50} (concentração inibitória de 50% dos parasitos) foram estimados em relação ao controle.

Ensaio de citotoxicidade sobre macrófagos de linhagem J774A1

Para a avaliação da citotoxicidade das substâncias, foi utilizado o ensaio de MTT. Para isso, macrófagos na concentração de 5×10^5 células/mL foram expostos às concentrações crescentes das substâncias por 48 h e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (BIO-TEK Power WaveXS spectrophotometer) a 570 nm. Os valores de CC_{50} (concentração citotóxica de 50%) foram estimados em relação ao controle.

Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e de lipoperoxidação

Promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com concentração referente ao IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ de **ACOP-1C** por 24 h foram incubadas com 10 μ M de H_2DCFDA ou DPPP para a detecção de espécies reativas de oxigênio e lipoperoxidação, respectivamente. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 488 e 530 nm, para H_2DCFDA e 355 e 460 nm para DPPP, respectivamente, em espectrofluorímetro.

Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), da integridade da membrana celular e do volume celular

Promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **ACOP-1C** por 24 h foram incubadas com 5 µg/mL de rodamina 123 (Rh123) ou iodeto de propídio (IP) para avaliação do potencial de membrana mitocondrial e da integridade de membrana respectivamente. Para a avaliação do volume celular, a análise foi feita através de gráficos da densidade (FSC-H) versus a dispersão (Counts). A análise foi realizada em citômetro de fluxo FACSCalibur equipado com o software CellQuest. Um total de 10.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida com o parasito.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Transmissão (MET) e Fluorescência

Promastigotas foram tratadas com a concentração referente ao IC₅₀ da substância **ACOP-1C** e incubados por 72 h. Após o período de incubação, foi realizada a fixação com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M. Para MEV, os parasitos foram aderidos à poli-L-lisina na lamínula, e realizado a desidratação em concentrações crescentes de álcool etílico. Em seguida, foi realizado o ponto crítico, metalização com ouro e os parasitos foram analisados no microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta 250. Para MET, as amostras foram pós-fixadas em uma solução de 1% de OsO₄, 0,8% de ferrocianeto de potássio e 10 mM CaCl₂ em 0,1 M de tampão cacodilato. Após, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona e incluídas em resina Polybed 812. Cortes ultrafinos foram obtidos e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e observados no microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM 1400. Para a microscopia de fluorescência, promastigotas tratadas com IC₅₀ e 2xIC₅₀ por 24 h foram incubadas com 10 µg/mL de vermelho do Nilo por 30 min a 22°C. A fluorescência foi observada pelo microscópio de fluorescência Olympus BX51 (Olympus, Tokyo, Japan) e as imagens foram obtidas com a câmera Olympus UC30 (Olympus, Tokyo, Japan). Adicionalmente, a fluorescência foi medida em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer) em um comprimento de onda de excitação e de emissão de 485 nm e 535 nm, respectivamente.

Resultados e Discussão

Os resultados mostraram que as substâncias **ACOP-1C** e **ACET-1** foram as mais eficazes contra promastigotas de *L. amazonensis*, exibindo valores de IC₅₀ de 23,2 e 28,9 µM. Ambas as substâncias foram as que apresentaram os melhores índices de seletividade (IS), 9,33 e 8,12, respectivamente, mostrando que são mais tóxicas para o parasito do que para as células hospedeiras. Assim, diante destes resultados, continuamos os demais experimentos de avaliação do mecanismo de ação com a substância **ACOP-1C**.

Em relação aos efeitos na produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e lipoperoxidação, os resultados mostraram um aumento dose-dependente para ambos, sendo de 3,0 e 9,0 vezes para EROs e 2,0 e 7,0

vezes para lipoperoxidação, após o tratamento com com IC_{50} e $2xIC_{50}$, respectivamente.

A perda do potencial de membrana mitocondrial também foi dose dependente, bem como a redução do volume celular. Em relação a alteração na membrana plasmática, apenas o tratamento com $2xIC_{50}$ induziu aumento na intensidade de fluorescência de IP (11,69%), indicando ruptura da membrana celular.

Com base nas microscopias, percebe-se também alterações morfológicas e ultraestruturais induzidas pelo **ACOP-1C**, incluindo redução do tamanho da célula, perda de conteúdo celular e presença de corpos de armazenamento lipídico.

Conclusões

Em conclusão, os presentes resultados demonstraram que a substância sintética **ACOP-1C** atua como forte ativador da morte de promastigotas de *L. amazonensis* pela desestabilização da homeostase do sistema redox. Contudo, mais estudos são necessários, no intuito de abrir caminhos para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos contra *L. amazonensis*.

Agradecimentos

Este estudo foi apoiado por CAPES, CNPq, FINEP, PRONEX / Fundação Araucária.

Referências

- [1] VERMELHO, A. B. **Carbonic anhydrases from Trypanosoma and Leishmania as anti-protozoan drug targets**. Bioorganic & Medicinal Chemistry 25 (2017) 1543–1555
- [2] LIÉVIN-LE MOAL V, LOISEAU PM. FEBS J. 2016;283:598–607
- [3] LOPEZ A. A. **Apoptotic protein profile in Leishmania donovani after treatment with hexaazatrinaphthylenes**. Experimental Parasitology 166 (2016)