

INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO LEISHMANICIDA DO CINAMALDEÍDO

Nathália Martins Franzoi (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Aline Ávila Brustolin, Thaís Gomes Verzignassi Silveira, e-mail: naty_franzoi@hotmail.com.

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

Área: Imunologia **subárea:** Imunologia Aplicada.

Palavras-chave: *Leishmania*, leishmaniose, cinamaldeído.

Resumo:

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. O tratamento ocorre a longo prazo (30 dias), por aplicação parenteral, endovenosa, não podendo ser interrompido. As drogas usadas apresentam elevada toxicidade, explicando assim a busca de alternativas para o tratamento, como o cinamaldeído. O objetivo deste trabalho foi investigar o mecanismo de ação anti-*Leishmania* do cinamaldeído sobre as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, visando o seu uso como tratamento par as leishmanioses. Nesse contexto, formas promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas com cinamaldeído por 24h e avaliadas em Microscópio Eletrônico de Varredura. O cinamaldeído também foi avaliado quanto à capacidade de fragmentar o DNA e de alterar a permeabilidade de membrana dos parasitos. Observou-se que o cinamaldeído promoveu alterações morfológicas e ultraestruturais importantes nas formas promastigotas de *L. amazonensis*. Maiss estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para compreender o mecanismo de ação anti-*Leishmania* do cinamaldeído.

Introdução

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas, de evolução crônica, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. São uma das seis doenças infecciosas mais importantes no mundo, endêmicas em 88 países, sendo que o Brasil é um dos 10 países com a maioria dos relatos de casos de leishmaniose cutânea no mundo (WHO, 2017).

A leishmaniose tegumentar (LT), umas das principais formas clínicas das leishmanioses, se manifesta como lesões ulceradas na pele e mucosas, propiciando marcas permanentes, desfiguração, debilidades e problemas psicossociais (BRASIL, 2017)

A primeira opção de tratamento para LT é baseada em antimoniais pentavalentes, como o Glucantime[®], durante 20 a 30 dias, por via endovenosa. A segunda opção é a anfotericina B, que requer administração

hospitalar. Ambas as opções de tratamento possui eficácia variável e elevada toxicidade (BRASIL, 2017), além de poder causar efeitos colaterais graves e desconforto ao paciente, proporcionando altos índices de desistência terapêutica, recidiva da doença e resistência do parasito.

O cinamaldeído, composto majoritário do óleo essencial extraído da casca da canela, possui diversas atividades antimicrobianas relatadas na literatura (XIE et al., 2017), além da atividade anti-*Leishmania* (dados ainda não publicados). Neste contexto é importante investigar o mecanismo de ação do cinamaldeído, visando seu uso como tratamento de leishmanioses.

Materiais e métodos

Microscopia Eletrônica de Varredura

Formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foram incubadas com cinamaldeído 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. A leitura foi realizada com um microscópio eletrônico de varredura EV JSM-6360 LV.

Fragmentação de DNA

L. amazonensis (1×10^7 parasitos/mL) foram tratadas com cinamaldeído durante 24 h. Os sedimentos foram ressuspensos em tampão de digestão (EDTA 10 mM, Tris-HCl 50 mM e pH 8,0 e laurilsulfato de sódio a 0,5%), adicionados 0,5 mg/ml de proteinase K e incubados em banho de gelo. A extração do DNA foi realizada com fenol e clorofórmio (1:1) e o DNA foi precipitado com acetato de sódio 3 M e etanol absoluto. O sedimento foi ressuspense em tampão Tris-EDTA (50 mL, pH 8,0). As alíquotas de DNA (10 mg) foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 2% e fotografadas sob luz ultravioleta. Amostras tratadas com peróxido de hidrogênio foram usadas como controle positivo e amostras sem tratamento como controle negativo de fragmentação.

Permeabilidade de Membrana

L. amazonensis (1×10^7 promastigotas/mL) foram tratadas com o cinamaldeído. Após 0, 4, 8, 24, 48, 72 e 96 h de incubação, foram tratadas com iodeto de propídio (10 mg/mL) durante 2 min. As observações foram realizadas com um microscópio de fluorescência EVOS FL (Molecular Probes Life Technology, Calrsbad, CA, USA) e pelo menos 200 células foram observadas em cada condição.

Resultados e Discussão

A avaliação das alterações morfológicas e ultraestruturais no parasito *Leishmania* após tratamento com cinamaldeído se faz importante, já que a permite conhecer mecanismos pela qual o composto atua no parasito.

O cinamaldeído promoveu importantes alterações morfológicas em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Na microscopia eletrônica de varredura ficou evidente a perda de flagelos e o arredondamento dos

parasitos tratados com cinamaldeído em relação aos não tratados. (Figura 1). No gel de agarose, da fragmentação de DNA, observou-se um arraste na amostra tratada com cinamaldeído semelhante ao controle positivo (Figura 2), demonstrando que o cinamaldeído age no DNA deste parasito promovendo fragmentação. Observou-se, ainda, alterações na permeabilidade de membrana dos parasitos, após 48 e 72h de incubação com o cinamaldeído (Figura 3).

Essas alterações podem ocorrer devido ao fato do cinamaldeído ser um composto com elevada lipofilicidade, característico de fenilpropanóides. A lipofilicidade do cinamaldeído permite que o cinamaldeído intercale em membranas lipídicas de vários microrganismos e se incorpore nas células (NOWOTARSKA, S. W. et al, 2017; VASCONCELOS et al., 2018; XIE et al., 2017). Isto sugere que o cinamaldeído interage com a membrana das células alterando sua estrutura, permeabilidade e a estabilidade dos constituintes intracelulares, o que pode ser responsável pela sua ação anti-*Leishmania*.

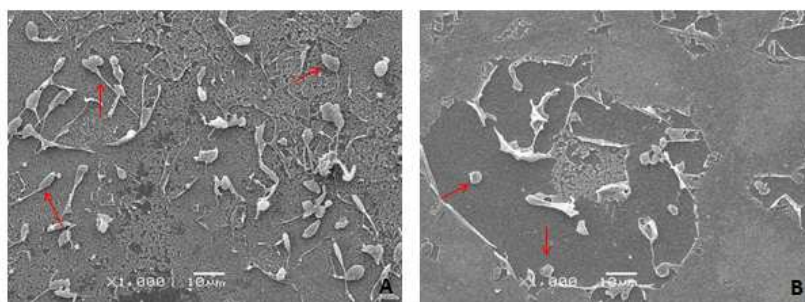


Figura 1. Microscopia eletrônica de varredura. (A) Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* sem tratamento (controle negativo) não tratados. (B) Formas promastigotas tratadas com cinamaldeído (200 µM) por 24 h. As setas destacam as formas promastigotas antes (A) e após o tratamento (B).

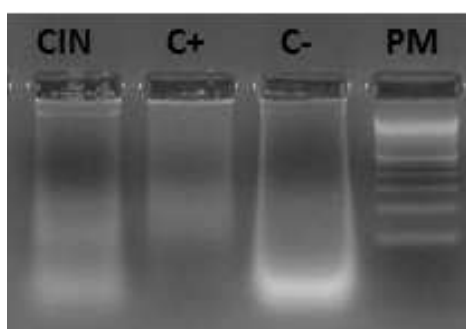


Figura 2. Gel de agarose da fragmentação de DNA. CIN: formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* tratadas com cinamaldeído (200 µM) por 24 h; C+: formas promastigotas tratadas com peróxido de hidrogênio (controle positivo de fragmentação); C-: formas promastigotas sem tratamento (controle negativo); PM: peso molecular.

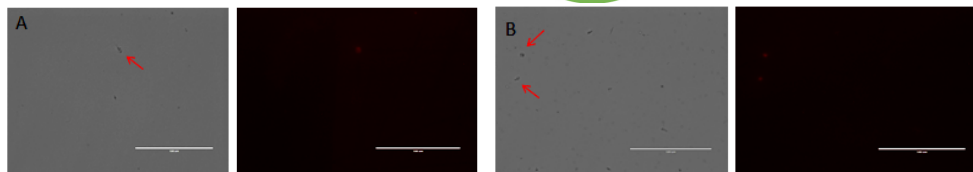


Figura 3. Alteração da permeabilidade de membrana após tratamento com cinamaldeído. Alterações encontradas nas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* após (A) 48h e (B) 72h de incubação com o cinamaldeído.

Conclusões

O cinamaldeído promoveu alterações morfológicas e ultraestruturais importantes nas formas promastigotas de *L. amazonensis*. Porém novos estudos *in vitro* e *in vivo* são necessários para compreender o provável mecanismo de ação anti-*Leishmania* do cinamaldeído.

Agradecimentos

Agradeço a minha orientadora Dra. Thais G. V. Silveira, a toda equipe do Laboratório de Imunologia Clínica – UEM, e ao CNPq pelo apoio financeiro.

Referências

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

World Health Organization. Technical Report Series 949- **Control of Leishmaniasis, 2017**. <http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>
Acesso em: 28 jul, 10:23.

NOWOTARSKA, S. W. et al. Mechanisms of Antimicrobial Action of Cinnamon and Oregano Oils, Cinnamaldehyde, Carvacrol, 2,5-Dihydroxybenzaldehyde, and 2-Hydroxy-5-Methoxybenzaldehyde against *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). **Stella W. Foods**, 2017. Acesso em: 30 jul. 2018.

Xie, Y. Structure-activity relationships of cinnamaldehyde and eugenol derivatives against plant pathogenic fungi. In: Huang, Q., Wang, Z., Cao, H., Zhang, D., 2017. **Ind. Crops Prod**, 2017. 97, 388–394.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.043>

Vasconcelos, Antibacterial Mechanisms of Cinnamon and its Constituents: a Review. In: N.G., Croda, J., Simionatto, S. **Microb. Pathog**, 2018.
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.04.036>