

ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DO 1,2-BIS [3-(2-METIL-1,3-DIOXOLAN-2-IL) FENIL] DITELANO

Natália Storck Ceroni (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Francielle Pelegrin Garcia Geremias (Co-orientador), Celso Vataru Nakamura (Orientador), e-mail: cvnakamura@gmail.com.

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Básicas da Saúde /Maringá, PR.

Ciências Biológicas - Microbiologia

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, leishmaniose, mitocôndria

Resumo:

A leishmaniose é causada por protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidos pela picada de fêmeas de insetos flebotomíneos. A leishmaniose cutânea esta associada a *L. amazonensis*, e é caracterizada por lesões na pele. No presente estudo avaliamos os efeitos da substância 1,2-bis [3-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il) fenil] ditelano (**LQ-6**) em formas promastigotas e os possíveis mecanismos de ação no protozoário. A substância **LQ-6** foi capaz de induzir estresse oxidativo nos parasitos, o que causou sua inibição.

Introdução

As leishmanioses são doenças zoonóticas tropicais causadas por protozoários pertencentes à família Trypanosomatidae do gênero *Leishmania* e são transmitidas pela picada de fêmeas de insetos flebotomíneos (DIPTERA: PSYCHODIDAE) (HARHAY et al., 2011).

Durante seu ciclo de vida, esses protozoários podem ser encontrados sob diferentes formas evolutivas, as principais são: promastigotas e amastigotas. As promastigotas são caracterizados por ter corpo celular alongado e flagelo livre. Esta forma, adaptada ao ambiente extracelular, é encontrada no intestido do inseto vetor. As amastigotas são caracterizadas por um corpo celular arredondado e flagelo internalizado. São adaptadas ao ambiente intracelular, sendo normalmente localizadas dentro dos vacúolos parasitóforos de macrófagos de mamíferos.

As principais manifestações clínicas da leishmaniose são: visceral ou kala-azar, cutânea, mucocutânea, difusocutânea e pós-kala-azar (COURA; DIAS, 2009). A leishmaniose cutânea (LC) é definida pela presença de lesões infectantes que causam deformações dermatológicas de aspectos variados e está associada à *Leishmania amazonensis* (SANTOS; 2013).

Atualmente, não existem vacinas para leishmaniose e os tratamentos disponíveis no mercado como Anfotericina B e miltefosina possuem limitações

(SCARIOT, 2017). Além do alto custo, o tratamento pode ser abandonado pelo paciente devido ao uso extensivo, falhas medicamentosas e efeitos colaterais.

Assim, considera-se importante a pesquisa de novas alternativas de tratamento para pacientes com leishmaniose.

Materiais e métodos

Atividade antiproliferativa sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*

Formas promastigotas em fase logarítmica (1×10^6 células/mL) foram tratadas com diferentes concentrações de 1,2-bis [3-(2-metil-1,3-dioxolan-2-il) fenil] ditelano (**LQ-6**) e a atividade antiproliferativa foi avaliada por contagem direta em câmara de Neubauer, a fim de se determinar a concentração inibitória de 50% dos parasitos (IC_{50}).

Ensaio de citotoxicidade sobre macrófagos de linhagem J774.A1

Macrófagos foram tratados com diferentes concentrações de **LQ-6** e avaliados pelo método de MTT. As absorbâncias foram lidas em espectrofotômetro (BIO-TEK Power WaveXS spectrophotometer) e a concentração citotóxica para 50% dos macrófagos (CC_{50}) foi determinada.

Microscopia eletrônica de varredura

Formas promastigotas (1×10^6 parasitos/mL) foram tratadas com **LQ-6** nas concentrações do IC_{50} e duas vezes o IC_{50} por 72 h. Em seguida, foram fixadas com glutaraldeído 2,5% e aderidas em um suporte (lamínula) com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich-Aldrich). As células aderidas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol, submetidas ao ponto crítico, metalizadas com ouro e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura FEI SCIOS.

Microscopia eletrônica de transmissão

Os parasitos foram tratados e fixados em glutaraldeído, como descrito para MEV. Em seguida, foram pós-fixados com tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio, desidratados com acetona e incluídos em resina EPON. Por fim, as amostras foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo e visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1400.

Determinação do volume celular do parasito

O volume celular dos parasitos tratados por 24h com o IC_{50} e $2 \times IC_{50}$ de **LQ-6** e controle (não tratados) foi analisado em citômetro de fluxo BD FACSCalibur. Um total de 10.000 eventos foram adquiridos na região que correspondia aos parasitos e histogramas foram gerados, FSC-H representou o volume da célula.

Determinação da integridade da membrana celular

A integridade da membrana celular foi determinada utilizando o corante iodeto de propídio (PI) (Invitrogen®). As células tratadas ou não (controle negativo) e marcadas com PI foram analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur.

Avaliação de corpos lipídicos

Nile Red (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foi utilizado para corar corpos lipídicos citoplasmáticos nos parasitos tratados. Estes foram visualizados e fotografados em microscópio de epifluorescência (Olympus BX51), com câmera Olympus UC30. As amostras foram também analisadas em um leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3, PerkinElmer), para quantificar a fluorescência.

Deteção de espécies reativas de oxigênio (EROS) total

A detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) total em parasitos tratados ou não com **LQ-6** foi realizada com o marcador H2DCFDA. A fluorescência foi medida utilizando um leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3; PerkinElmer).

Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

A determinação do potencial transmembrânico mitocondrial foi realizada de duas maneiras: primeiro os parasitos tratados ou não com **LQ-6**, foram analisados por fluorimetria (Victor X3; PerkinElmer), usando o marcador Tetrametilrhodamina (TMRE). Paralelamente, os parasitos também foram analisados por citometria de fluxo (BD FACSCalibur), utilizando o corante catiônico Rodamina 123 (Rh 123) (Sigma®, St Louis, MO, USA).

Avaliação da produção de ATP

Para a avaliação da produção de ATP foi utilizado o Kit ATP (Promega). A luminescência foi quantificada em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software Prism 7.04 (GraphPad, San Diego, CA, EUA).

Resultados e Discussão

A substância **LQ-6** se mostrou muito mais seletiva (IS: 23) para o parasito, isto significa que é 23 vezes mais ativo contra o protozoário do que contra o macrófago.

A microscopia eletrônica de varredura mostrou uma alteração na morfologia dos parasitos, afetando o tamanho e formato do corpo celular e flagelo. Na microscopia eletrônica de transmissão observamos desorganização do conteúdo citoplasmático, inclusões lipídicas, alteração no cinetoplasto e inchaço mitocondrial.

A fim de investigar melhor essas alterações, foram realizados vários testes com marcadores fluorescentes. Por citometria de fluxo, foi observada uma diminuição de 12% do volume celular nos parasitos tratados com **LQ-6** e hiperpolarização mitocondrial, porém não houve alteração na integridade de membrana plasmática. Adicionalmente, foi verificado um acúmulo de corpos lipídicos, um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e diminuição da produção de ATP.

Conclusões

A substância **LQ-6** foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* e apresentou IS de 23 vezes mais seletivo para o protozoário. Os experimentos também revelaram que **LQ-6** induziu uma diminuição do volume celular, aumento da produção de EROs totais, causou hiperpolarização na membrana mitocondrial, aumento de inclusões lipídicas e diminuição da produção de ATP, induzindo extenso estresse oxidativo nos parasitos, o que justifica sua boa atividade. Esses resultados juntos nos indicam o potencial dessa substância como uma futura candidata para o desenvolvimento de novos fármacos antileishmania.

Agradecimentos

CAPES, CNPq e PRONEX/Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

Referências

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 104 Supl, 31–40, 2009.

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in parasitology**, Elsevier B. V. 27, 9, 403-409, 2011. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S147149221100064X?via%3Dihub>. Acesso em: Junho 28, 2019.

SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 108, 1, 59-64, 2013.

SCARIOT, D. B. et al. Induction of early autophagic process on *Leishmania amazonensis* by synergistic effect of miltefosine and innovative semi-synthetic thiosemicarbazone. **Frontiers in microbiology**, 8, 255, 2017.