

## EFEITOS DA SUBSTÂNCIA 4-(5'-formil-[2,2'-bitiofeno]-5-il)but-3-in-1-il acetato (ACET-1) SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis*

Rayanne Regina Beltrame Machado (PRONEX/CNPq/FA/UEM), Danielle Lazarin-Bidóia (coorientadora), 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, Brasil.

**Área e subárea do conhecimento: Parasitologia,**

**Palavras-chave:** Leishmanioses, morte celular, mecanismo de ação.

### Resumo:

Leishmaniose é uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas que ocorre em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Conseqüentemente, o desenvolvimento de novos agentes farmacológicos é urgentemente necessário. Neste estudo, o objetivo foi avaliar os efeitos bioquímicos causados pela substância **ACET-1** sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, uma vez que nosso grupo já mostrou anteriormente que esta substância tem atividade anti-leishmania e baixa toxicidade em células de mamíferos. Os resultados mostraram que essa substância induziu alterações morfológicas e ultraestruturais no parasito, como alterações na membrana plasmática e citoesqueleto. Também ocorreram alterações bioquímicas, como aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, peroxidação lipídica e óxido nítrico, além de diminuição no volume celular e despolarização da mitocôndria. As alterações na integridade da membrana celular não foram muito evidentes. Portanto, a substância **ACET-1** provavelmente levam à morte do protozoário *L. amazonensis* por desestabilização da homeostase redox do parasito.

### 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 (VERMELHO, 2017). Nas Américas, os casos de leishmaniose visceral atingiram uma taxa de letalidade de 7,9%, e os casos de leishmaniose cutânea em crianças menores de 10 anos registraram valores maiores que 15,5%, no ano de 2016 (OPAS/OMS, 2018).

Mosquitos fêmeas pertencentes ao gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia* transmitem os protozoários através da circulação sanguínea (LIÉVIN-LE, 2016). A resposta imune gerada durante a infecção por *Leishmania* pode levar à uma resposta inflamatória exacerbada e, conseqüentemente, 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 esses fármacos são normalmente tóxicos para o paciente, mesmo em doses baixas (LOPEZ, 2016) e por isso, há a necessidade de se desenvolver novos agentes terapêuticos para o tratamento de pacientes com leishmaniose.

Nesse contexto, nosso grupo de pesquisa já mostrou que a substância 4-(5'-formil-[2,2'-bitiofeno]-5-il)but-3-in-1-il acetato (**ACET-1**) tem atividade anti-leishmania com o valor de  $IC_{50}$  de 28,9  $\mu$ M. Baseado nisso, o objetivo desse trabalho foi avaliar os efeitos bioquímicos causados pela substância **ACET-1** sobre formas promastigotas de *L. amazonensis*.

## Materiais e métodos

### *Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e de lipoperoxidação*

Promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com concentração referente ao  $IC_{50}$  e  $2 \times IC_{50}$  (28,9  $\mu$ M e 57,8  $\mu$ M) de **ACET-1** por 24 h foram incubadas com 10  $\mu$ 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 (Victor X3; PerkinElmer).

### *Avaliação da produção de óxido nítrico*

Promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **ACET-1** por 24 h foram incubadas com 1  $\mu$ M de DAF-FM diacetato por 30 min, protegidos da luz. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de excitação e de emissão de 495 e 515 nm respectivamente, em espectrofluorímetro (Victor X3; PerkinElmer).

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

Promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **ACET-1** por 24 h foram incubadas com 5  $\mu$ g  $ml^{-1}$  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 Confocal*

Promastigotas foram tratadas com a concentração referente ao  $IC_{50}$  e  $2xIC_{50}$  da substância **ACET-1** 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, 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 Scios. Para MET, as amostras foram pós-fixadas em uma solução de 1% de  $OsO_4$ , 0,8% de ferrocianeto de potássio e 10 mM  $CaCl_2$  em 0,2 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 confocal a laser, as promastigotas foram tratadas por 24 h e incubadas com  $10 \mu g\ ml^{-1}$  de Vermelho do Nilo por 30 min a 22 °C. A fluorescência foi observada em microscópio confocal (Zeiss LSM-5 Pascal), e as imagens foram obtidas com a câmera AxioCam HRc (Zeiss). Adicionalmente a fluorescência foi medida no leitor de microplacas (Victor X3; PerkinElmer) em um comprimento de onda de excitação e de emissão de 485 nm e 535 nm, respectivamente.

### Resultados e Discussão

A substância **ACET-1** induziu a produção de EROs sobre promastigotas de *L. amazonensis* de forma dose dependente, com um aumento de 3,0 e 5,0 vezes, após o tratamento com  $IC_{50}$  e  $2xIC_{50}$  respectivamente. Já os níveis de óxido nítrico aumentaram 10,0 vezes após o tratamento com  $IC_{50}$  e 5,0 vezes após o tratamento com  $2xIC_{50}$ . Altos níveis de peroxidação lipídica também foram observados, com um aumento significativo de 10,0 vezes em ambos os tratamentos.

A perda do potencial de membrana mitocondrial só foi evidente após o tratamento com  $2xIC_{50}$  de **ACET-1**, enquanto a redução do volume celular foi notada após o tratamento tanto com  $IC_{50}$  quanto com  $2xIC_{50}$ . As alterações na membrana plasmática indicadas pela fluorescência de IP não foram significativas indicando que a integridade da membrana celular foi mantida.

Por MEV, foi possível observar alterações morfológicas como torção, perda de conteúdo e diminuição do volume celular e as imagens de MET mostraram alterações no núcleo, na bolsa flagelar, com aumento da quantidade de vesículas do complexo de Golgi, alterações na membrana plasmática e citoesqueleto e, presença de corpos lipídicos.

A formação e acúmulo de corpos lipídicos após o tratamento com  $IC_{50}$  e  $2xIC_{50}$  de **ACET-1** foi observada também por microscopia confocal a laser usando o marcador fluorescente vermelho do Nilo, o qual se liga à lipídios neutros. O aumento desses corpos lipídicos pode ser confirmado por espectrofluorimetria, no qual houve um aumento de 1,6 e 2,0 vezes na intensidade da fluorescência.

### Conclusões

Os resultados demonstraram que a substância sintética **ACET-1** atua como forte ativador da morte de promastigotas de *L. amazonensis* pela desestabilização da homeostase do sistema redox, acrescentado das alterações ultraestruturais e morfológicas que são de grande importância biológica. Estudos adicionais sobre essas alterações podem abrir caminhos para o desenvolvimento de novos agentes quimioterápicos contra *Leishmania amazonensis*.

### Agradecimentos

A CAPES, CNPq, FINEP, PRONEX / Fundação Araucária.

### Referências

LIÉVIN-LE M. V., LOISEAU P. M., *FEBS J* 2016, 283:598–607

LOPEZ A. A. **Apoptotic protein profile in *Leishmania donovani* after treatment with hexaazatrinaphthylenes.** *Experimental Parasitology* 2016, 166

OPAS/OMS, LEISHMANIOSES Informe Epidemiológico das Américas, **Informe de Leishmanioses N° 6** - Fevereiro, 2018

VERMELHO, A. B. **Carbonic anhydrases from *Trypanosoma* and *Leishmania* as anti-protozoan drug targets.** *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2017, 25:1543–1555