

AValiação DA INTERAÇÃO ENTRE O Óleo ESSENCIAL DE *Tetradenia riparia* E CETOCONAZOL OU ANFOTERICINA B EM AMASTIGOTAS DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Antonio Henrique Pereira dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/Uem)¹, Mariana de Souza Terron-Monich¹, Karine Patel Sartori¹, Izabel Galhardo Demarchi¹, Zilda Cristiani Gazim², Maria Valdrinez Campana Lonardoni¹, Jorge Juarez Vieira Teixeira¹ (Orientador) e-mail: jjvteixeira@gmail.com

¹Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências da Saúde/ Maringá, PR.

²Universidade Paranaense/ Umuarama, PR.

Ciências da Saúde/ Doenças infecciosas e parasitárias

Palavras-chave: Leishmaniose, terapia combinada, fitoterapia.

Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) combinado com cetoconazol (KET) ou anfotericina B (AmB) em formas amastigotas de *Leishmania Leishmania (amazonensis) (LLa)*. Macrófagos infectados com *LLa* foram tratados com TrEO (50; 25; 12,5 µg/mL), KET (30; 7,5 e 1,8 µg/mL) e AmB (1,2; 0,3 e 0,075 µg/mL) de forma individual e combinados entre si e incubados por 24 h. Após, as células foram coradas pelo método de coloração rápida Panótico e analisadas ao microscópio óptico. O índice de combinação (CI), dose-redução (DRI), efeitos sinérgicos (CI<1) aditivos (CI=1) e antagônicos (CI>1) foram calculados utilizando o software CompuSyn. TrEO e KET apresentaram sinergismo (CI=0,80) na combinação de 50 µg/mL e 30 µg/mL, respectivamente. Para TrEO e AmB, o sinergismo com maior DRI (71,8) e menor CI (0,31) foi combinando 50 µg/mL e 0,075 µg/mL respectivamente. Ambas associações se mostraram promissoras para o tratamento da leishmaniose, entretanto, estudos *in vivo* devem ser realizados para confirmar tais efeitos.

Introdução

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma das infecções dermatológicas mais importantes, devido à sua magnitude, sendo que no Brasil, afetou cerca de 20 mil pessoas no ano de 2014. A LTA é causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania sp.*, transmitidos pela picada de flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia*. Caracteriza-se pela diversidade das apresentações clínicas, classificadas como cutâneas localizadas, cutânea difusa (lesões nodulares disseminadas) e mucocutânea (atinge principalmente as mucosas nasais e da orofaringe), dependendo das espécies envolvidas. No país, sete espécies de *Leishmania* estão envolvidas no desenvolvimento da doença, sendo a espécie *Leishmania (L.) amazonensis* uma das principais, e responsável pela leishmaniose cutânea difusa, uma forma rara, mas grave da doença, (BRASIL, 2010).

Atualmente há dois principais tipos de fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose: antimoniato de meglumina e anfotericina B. Além deles existem

drogas alternativas como o cetoconazol, fluconazol e itraconazol. Entretanto, estes fármacos apresentam diversos efeitos adversos como: vômitos, náuseas, hepatotoxicidade, problemas cardíacos e até o óbito, o que estimula o desenvolvimento de estudos que buscam novas formas de tratamento (BRASIL, 2010; GOTO E LINDOSO, 2010).

A terapia combinada tem se destacado como alternativa ao tratamento de doenças como a leishmaniose. Trata-se da utilização de medicamentos com diferentes mecanismos de ação e vias de administração, já utilizados na clínica e que podem ser combinados entre si ou a novos compostos, melhorando sua resposta. (GOTO E LINDOSO, 2010).

Estudos com compostos derivados de produtos naturais também tem apresentado resultados favoráveis para sua utilização como alternativa para o tratamento da doença. Dentre esses, o óleo essencial de *Tetradenia riparia* apresentou efeitos anti-*Leishmania* em formas promastigotas e amastigotas em *L. amazonensis* (DEMARCHI *et al*, 2015). Assim, este estudo teve como objetivo avaliar a interação entre o óleo essencial de *T. riparia* e cetoconazol ou anfotericina B em amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Materiais e métodos

Macrófagos J774.A1 foram esterilmente cultivados sobre lamínulas de vidro em microplacas de 24 poços por 48 horas a 37°C com 5% de CO₂, para desenvolvimento da monocamada. Após a incubação as células foram infectadas com *L. (L.) amazonensis* e tratadas com o TrEO (50 µg/mL; 25 µg/mL e 12,5 µg/mL), anfotericina B (1,2 µg/mL; 0,3 µg/mL e 0,075 µg/mL) e cetoconazol (30 µg/mL; 7,5 µg/mL e 1,8 µg/mL) de forma individual e combinadas entre si. Macrófagos não tratados com drogas foram utilizados como controle. Após 24 h, as lamínulas foram coradas com a coloração rápida Panóptico e analisadas ao microscópio óptico. Dessa forma foi obtido o índice de infecção, que é dado pela multiplicação da porcentagem de macrófagos infectados pelo o número médio de parasitos por célula. Os experimentos foram realizados em triplicata e em três ensaios independentes. O índice de combinação (CI<1: efeitos sinérgicos; CI=1 e CI>1 antagônicos), índice de dose-redução (DRI), foram calculados utilizando o software CompuSyn. Os isobogramas foram construídos a partir desses valores, no programa excel. Para análise estatística foi realizada a verificação de normalidade dos dados e aplicado um teste de análise de variância.

Resultados e Discussão

Ao se analisar as combinações entre o TrEO e cetoconazol e TrEO e anfotericina B, observou-se que ambas são potenciais alternativas para o tratamento da leishmaniose, pois apresentaram efeitos sinérgicos e aditivos (Figura 1 e 2). Esses resultados corroboram com o mostrado por Terron *et al* (2017), que encontrou os mesmos efeitos dessas combinações em promastigotas de *L. amazonensis*. Na combinação de TrEO com anfotericina B três combinações apresentaram efeitos sinérgicos e duas aditivos (Figura 1). Dentre essas, a mistura que apresentou um efeito sinérgico com menor valor de CI (0,31) foi de 50 µg/ mL de TrEO com 0,075

$\mu\text{g}/\text{mL}$ de AmB além de um DRI de 3,27 e 71,8 respectivamente (dados não mostrados). Em relação a associação de TrEO e cetoconazol o sinergismo ($\text{CI}=0,80$) foi observado nas concentrações de $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ e $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ dos fármacos, respectivamente, com DRI de 3,27 (TrEO) e 1,99 (KET). Ainda, observou-se um efeito moderadamente aditivo com CI de 0,94 e com DRI de 1,21 para o TrEO e de 8,47 para o cetoconazol O índice de dose-redução indica o quanto se pode reduzir de cada fármaco, quando combinados, para que apresente o mesmo efeito de quando administrado individualmente. Assim, podemos observar que ambas associações e os diferentes efeitos apresentados, possuem um DRI que permite uma redução da dose dos fármacos cetoconazol e anfotericina B, o que pode contribuir para diminuir a toxicidades desses fármacos.

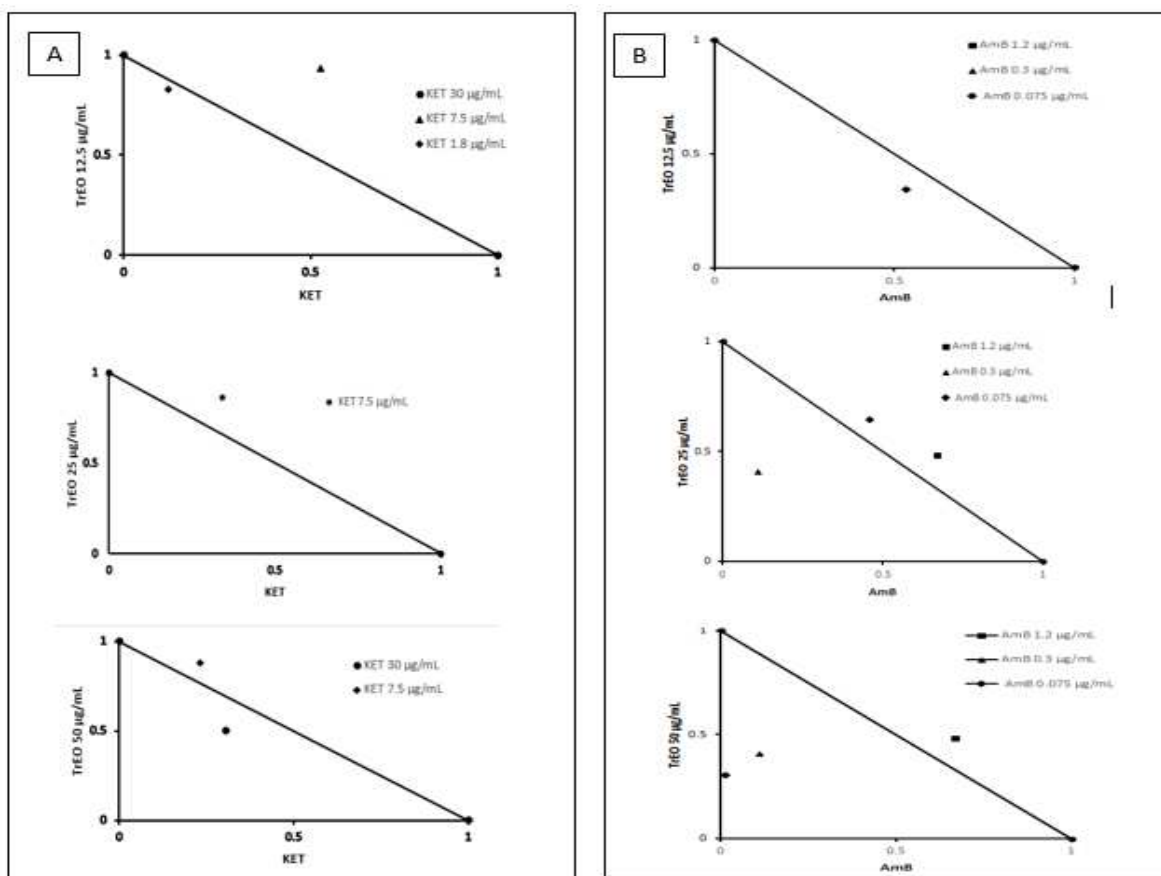


FIGURA 1 - Isobogramas normalizados representativos das interações de TrEO e KET (A) e TrEO e AmB (B) na DL50 das diferentes combinações. As linhas cruzam o eixo X e Y nas concentrações normalizadas de DL50 quando os compostos foram testados sozinhos e os símbolos representam as concentrações normalizadas das drogas testadas em combinação para atingir o mesmo efeito. Pontos abaixo da linha representam efeitos sinérgicos, pontos sob ou logo após a linha representam efeitos aditivos e pontos acima da linha representam efeitos antagônicos. Efeitos com $\text{CI}>1,25$ não estão representados nos gráficos.

As combinações apresentaram uma amplitude de efeitos, que variaram entre sinérgico, aditivo e antagônico (Figura 1). Essa variação também foi observada em outros estudos que avaliaram a combinação de fármacos *in vitro*, contra *Leishmania* e pode estar associada a diversos fatores como mecanismo de ação,

biodisponibilidade, solubilidade, entre outros (CORRAL *et al*, 2014; TERRON 2017). Os efeitos sinérgicos e aditivos dessas combinações também podem estar relacionados aos mecanismos de efeito dos fármacos, já que todos apresentam como alvo a membrana celular do parasito (DEMARCHI *et al*, 2015; TERRON, 2017)

Conclusões

Tanto a combinação do óleo essencial de *Tetradenia riparia* com cetoconazol, quanto com anfotericina B apresentaram efeitos sinérgicos e aditivos para formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Desse modo, este estudo serve de base para futuros estudos *in vivo* para comprovar de fato o potencial dessa combinação de fármacos para o tratamento da doença.

Agradecimentos

Ao CNPq, à Universidade Estadual de Maringá, ao laboratório de Imunologia Clínica, ao Professor Jorge Juarez Vieira Teixeira, meu orientador, à Professora Maria Valdrinez Campana Lonardoni, minha co-orientadora, por todo apoio e disposição.

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. Editora do Ministério da Saúde, 2010.

CORRAL, J. M; SERRANO, D. R; MORENO, I. J; TORRADO, J; DOMÍNGUEZ, M. ALUNDA, J. M. Efficacy of low doses of amphotericin B plus allicin against experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, vol. 69, p. 3268 –3274, 2014.

DEMARCHI, I. G, THOMAZELLA, M. V; TERRON, M. S; LOPES, L; GAZIM, Z. C; CORTEZ, D. A. G; DONATTI, L; ARISTIDES, S. M. A; SILVEIRA, T. G. V; LONARDONI, M. V. C. Antileishmanial activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from *Tetradenia riparia*. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 128–137, 2015

GOTO, H; LINDOSO, J. A. L. **Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis**. Expert Review of Anti-Infective Therapy. 2010.

TERRON, M. S. **Atividade anti-*Leishmania* do óleo essencial de *Tetradenia riparia* associado ao cetoconazol ou a anfotericina B, in vitro**. 2017. Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2017.