

## **ÓLEO ESSENCIAL DE *Tetradenia riparia* ASSOCIADO AO CETOCONAZOL OU À ANFOTERICINA B PARA O TRATAMENTO DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR: AVALIAÇÃO EM CAMUNDONGOS INFECTADOS COM *Leishmania (L.) amazonensis***

Antonio Henrique Pereira dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Mariana de Souza Terron-Monich, Karla Ganazza, Aline Ávila, Zilda Cristiani Gazim, Maria Valdrinez Campana Lonardoní, Jorge Juarez Vieira Teixeira (Orientador) e-mail: jjvteixeira@gmail.com

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

**Área do CNPq: Ciências da Saúde/ Doenças infecciosas e parasitárias**

**Palavras-chave:** Leishmaniose, terapia combinada, fitoterapia

### **Resumo:**

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da associação do óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) e cetoconazol (CETO) ou anfotericina B (AmB) no tratamento de camundongos BALB/c infectados experimentalmente com *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LLa). Amostras de baço e gânglio dos animais tratados com TrEO 60 mg/mL, CETO 40 mg/kg e AmB 5 mg/kg/dia de forma isolada ou combinada, e de animais infectados e não tratados, foram maceradas e o DNA extraído. A pureza e concentração do DNA das amostras foi avaliada em NanoDrop e Qubit, respectivamente. A carga parasitária desses órgãos foi avaliada de forma semi-quantitativa por meio da densitometria das bandas obtidas pela reação em cadeia da polimerase (PCR), com o *software* ImageJ. A maioria das amostras apresentou um bom grau de pureza do DNA, com valores entre 1,8 e 1,94, e a concentração de DNA variou entre 8,2 ng/mL e 334 ng/mL. As análises revelaram a presença de DNA de *Leishmania* apenas em amostras de gânglio dos grupos infectados e não tratados, tratados somente com CETO, ou CETO +TrEO, não havendo diferença significativa entre a porcentagem de DNA dessas amostras. Os resultados indicam que esquemas de tratamento com TrEO e AmB sozinhos ou em combinação podem ser promissores para a terapia da LTA. Entretanto, outros parâmetros devem ser avaliados para confirmar a eficácia desses tratamentos.

### **Introdução**

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, negligenciada, endêmica no território brasileiro, e causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania sp.* A LTA pode afetar a pele e mucosas de forma localizada ou difusa. A forma difusa, embora rara é

a mais grave e é causada pela espécie *Leishmania (L.) amazonensis* (BRASIL, 2017).

O tratamento da LTA é realizado com os antimoniais pentavalentes ou anfotericina B, que apresentam sérios efeitos colaterais e toxicidade, além da necessidade de ambiente ambulatorial para sua administração. Assim, a adesão ao tratamento pode ser baixa, diminuindo sua eficácia, o que torna necessária a busca por alternativas terapêuticas (BRASIL, 2017; GOTO e LINDOSO, 2010). As plantas e os produtos naturais são uma alternativa terapêutica, devido com menor toxicidade e menores custos. O óleo essencial de *Tetradenia riparia* mostrou atividade anti-*Leishmania* tanto para formas promastigota como amastigota destes parasitos (DEMARCHI *et al*, 2015). A proposta de combinação da terapia com o óleo essencial de *T. riparia* e fármacos já usados pode se tornar um tratamento promissor para a LTA, com maiores taxas de cura, redução dos efeitos adversos e do tempo de tratamento (BERBERT *et al*, 2018). Assim, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito do tratamento com o óleo essencial de *Tetradenia riparia* associado ao cetoconazol ou à anfotericina B em camundongos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis*.

## Materiais e métodos

Foram usadas amostras obtidas em projeto anterior (aprovação conforme CEUA 2096250517). Resumidamente, camundongos BALB/c foram infectados na pata posterior direita com  $2 \times 10^7$  promastigotas /mL de *LLa*. Após o aparecimento da lesão (aprox. 30 dias), foram constituídos seis grupos com 10 animais: G1) tratamento tópico com o TrEO 60 mg/mL; G2) tratamento oral com cetoconazol 40 mg/kg; G3) animais infectados e não tratados (controle positivo); G4) tratamento oral com cetoconazol 40 mg/kg associado ao TrEO tópico 60 mg/mL; G5) tratamento via intraperitoneal com anfotericina B 5 mg/kg/dia; G6) tratamento via intraperitoneal com anfotericina B, 5 mg/kg/dia associado ao TrEO 60 µg/mL. O tratamento foi realizado durante 30 dias, sendo o cetoconazol e anfotericina B administrados uma vez ao dia e o TrEO duas vezes ao dia. Três semanas após o término do tratamento, os animais foram eutanaziados e tiveram o linfonodo poplíteo regional e o baço retirados. Esses órgãos foram pesados e, em seguida, macerados e armazenados em tampão ACD a  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

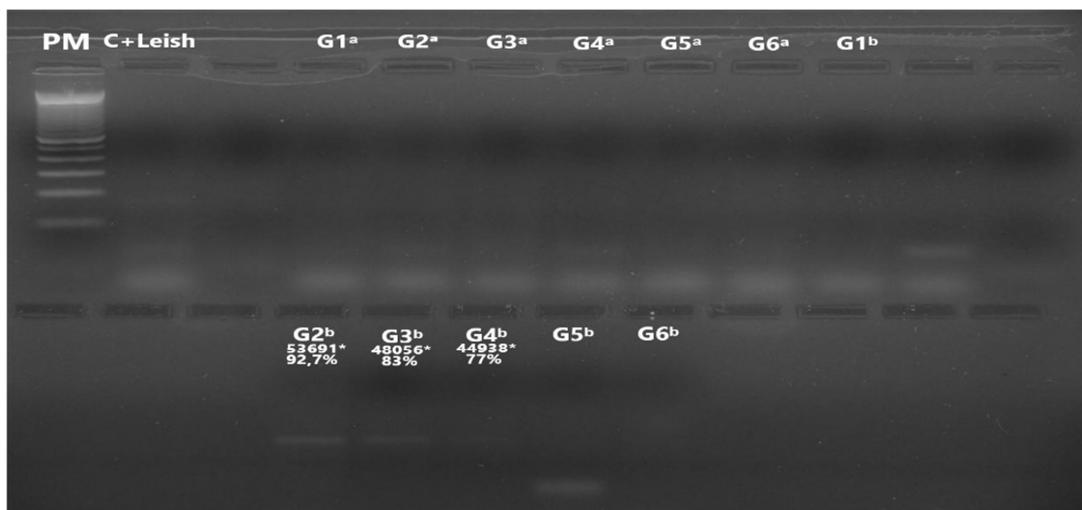
O DNA das amostras de macerados de linfonodos e baços, dos camundongos, foram extraídos de 25 mg de tecido com solução GT. A pureza e concentração de DNA foi avaliada em Nanodrop e Qubit, respectivamente. Após, analisou-se a presença ou a ausência de DNA de *LLa* nas amostras pela reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando os iniciadores *Lrib F/R* (167pb). As amostras positivas foram avaliadas de forma semi-quantitativa por meio da densitometria das bandas usando o software ImageJ. Os dados de densidade foram normalizados utilizando um controle positivo puro de DNA de *LLa*. Para controle interno da reação foi utilizado o gene GAPDH, constitutivo de camundongos.

Para análise estatística foi realizado o teste de análise de variância de Kruskal-Wallis, sendo considerados significativos os valores de  $p < 0,05$ .

## Resultados e Discussão

Ao todo 30 amostras, sendo elas de baço e gânglio, foram estudadas. Dessas, 12 amostras (4 de baço e 8 de gânglio) foram selecionadas como representativas dos grupos, para a dosagem de pureza e concentração de DNA em NanoDrop e Qubit, respectivamente. Essa triagem foi realizada com o objetivo de validar o método de extração, garantindo a qualidade dessas amostras para posterior realização do PCR convencional e também do PCR em tempo real. A maioria das amostras apresentaram um bom grau de pureza de DNA, com valores entre 1,8 e 1,94, já a concentração de DNA variou entre 8,2 ng/mL e 334 ng/mL.

A PCR revelou que as amostras obtidas do baço foram negativas para a presença de DNA de *Leishmania* em todos os grupos, indicando que não houve visceralização da infecção (Fig. 1). No caso das amostras de gânglio, apenas três foram positivas para presença de DNA de *Leishmania*: G2<sup>b</sup>, G3<sup>b</sup>, G4<sup>b</sup>, sendo elas amostras representativas dos grupos de animais tratados com Cetoconazol, não tratadas e do grupo cetoconazol + TrEO. A densitometria das bandas indicou uma carga parasitária correspondente a 92,7%, 83% e 77% de DNA de *Leishmania*, respectivamente (Fig. 1).



**Figura1.** Análise da carga parasitária de baço e gânglio por meio da reação em cadeia da polimerase e densitometria das bandas. PM: Peso Molecular (PM) e logo em seguida o C+Leish: Controle Positivo de *Leishmania* (com 167pb). (a) amostras de baço, (b) amostras de gânglio. (\*) Valores da densitometria e percentual (%) de suas respectivas bandas.

Não houve diferença significativa entre a carga parasitaria dessas amostras, indicando que tanto o tratamento com CETO sozinho ou em combinação com TrEO não tiveram efeito. Entretanto, a redução do percentual da carga

parasitária observada no grupo G4<sup>b</sup> indica que pode haver uma interação na utilização da combinação desses fármacos, corroborando com os resultados *in vitro*, de TERRON, 2017, que mostrou uma ação sinérgica dessa combinação contra *LLa*. Esse mesmo estudo também mostrou um sinergismo na combinação de TrEO e Amb, que não pudemos comprovar nessa avaliação. A positividade para o gene GAPDH, usado como controle interno, foi observada em todas as amostras validando o teste realizado.

## Conclusões

Os resultados indicaram o potencial da terapia individual ou combinada com TrEO e AmB para o tratamento da LTA. Entretanto, outros parâmetros como análise histológica, tamanho e volume das lesões, devem ser analisadas em conjunto com a carga parasitária para confirmar a eficácia desses tratamentos.

## Agradecimentos

Ao CNPq, à Universidade Estadual de Maringá, ao laboratório de Imunologia Clínica, ao Prof. Jorge Juarez Vieira Teixeira, meu orientador, à Prof<sup>a</sup> Maria Valdrinez C. Lonardon, minha co-orientadora, por todo apoio e disposição.

## Referências

ROCHA, T.; BERBERT, N.; PERLES DE MELLO, T. F.; et al. Pentavalent Antimonials Combined with Other Therapeutic Alternatives for the Treatment of Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: **A Systematic Review**. **Hindawi Dermatology Research and Practice**, v. 2018, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. - Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

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

DEMARCHI, I. G; THOMAZELLA, M. V; TERRON, M; et al. Antileishmanial activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from *Tetradenia riparia*. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 128–137, 2015.

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.