

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE *IN VITRO* DO FARNESENO FRENTE ÀS FORMAS EVOLUTIVAS DE *Leishmania amazonensis*

Vitória Martins Prizão (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Thaysa Ksiaskiewicz Karam (PCF), Celso Vataru Nakamura (Orientador), e-mail: cvnakamura@gmail.com.

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

Ciências da Saúde – Microbiologia (21200009)

Palavras-chave: Leishmaniose, fitoterapia, farneseno.

Resumo:

As doenças tropicais negligenciadas acometem a vida de milhões de pessoas. Dentre essas, destaca-se a leishmaniose; cujo alto número de acometidos está relacionado a um tratamento restrito (de baixa eficácia, insegurança e alta toxicidade). Nesse contexto, novos compostos que possuam um maior efeito contra a zoonose e apresentem menos efeitos colaterais são pesquisados, dentre eles o Farneseno, composto majoritário da *Matricaria chamomilla*. O objetivo deste trabalho foi investigar a atividade e alterações morfológicas e ultraestruturais causadas pelo farneseno sobre as formas evolutivas de *Leishmania amazonensis*. Para isso, foi avaliada a atividade frente às formas de *L. amazonensis* e a citotoxicidade frente à macrófagos J774A.1 e as alterações morfológicas e ultraestruturais. Os resultados ainda estão sendo computados, porém já é possível compreender que o Farneseno apresenta atividade considerável contra as formas avaliadas.

Introdução

Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (ORYAN A.; BAHRAMI S.; BEMANI E., 2018). Ela é transmitida por mosquitos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, por meio do repasto sanguíneo (ORYAN A.; BAHRAMI S.; BEMANI E., 2018). De ciclo heteroxênico, o parasita intracelular obrigatório em questão apresenta a forma promastigota no trato digestório do mosquito (hospedeiro intermediário), e a forma amastigota, encontrada nos vertebrados (hospedeiro definitivo) SERENO D.; HARRAT Z.; EDDAIKRA N., 2019). O tratamento para as leishmanioses é selecionado conforme região, possível agente etiológico causador e manifestações clínicas (JAFFARY *et al.*, 2016). A terapêutica disponível apresenta eficácia limitada, alta toxicidade e custo

elevado (ORYAN A.; BAHRAMI S.; BEMANI E., 2018; SERENO D.; HARRAT Z.; EDDAIKRA N., 2019); assim, a pesquisa por novos componentes com atividade antileishmania se faz necessária.

A *Matricaria chamomilla L* é uma das alternativas em questão, visto que sua atividade contra a doença já foi evidenciada em pesquisas prévias. Tais atividades são atribuídas principalmente a seu óleo essencial, que tem como um dos principais componentes o farneseno (STANOJEVIC *et al.*, 2016). Assim, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade e alterações morfológicas e ultraestruturais causadas pelo tratamento com farneseno sobre as formas evolutivas de *Leishmania amazonensis*.

Materiais e métodos

Cultivo dos parasitos e dos macrófagos J774A1

As formas evolutivas de promastigotas de *L. amazonensis* (cepa WHOM/BR/75/JOSEFA) foram cultivadas em meio Warren, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e incubadas à 25 °C. A linhagem celular de macrófagos J774A1 foi mantida em meio RPMI 1640 suplementado 10% de SFB, mantidos à 37 °C e 5% de CO₂.

Avaliação da atividade do farneseno frente às formas promastigotas de L. amazonensis

As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram semeadas, com um inóculo inicial de 1×10⁶ células/mL em meio de cultura suplementado, em placas de 96 poços na presença de diferentes concentrações de farneseno ou apenas meio de cultura (grupo controle), para avaliar a taxa de sobrevivência do parasito (VOLPATO *et al.*, 2018). Após incubação, foi contado em câmara de Neubauer, sendo então os resultados expressos como a concentração inibitória de 50% dos parasitos (CI₅₀) em relação ao controle.

Avaliação da atividade farneseno frente às formas amastigotas intracelulares de L. amazonensis

Foram dispensados macrófagos J774A1 (5×10⁵ células/mL) e promastigotas (5 × 10⁶ parasitos/mL) em placas de 24 poços, contendo lamínulas de vidro redondas. Após incubação para promover interação, as células receberam tratamento com diferentes concentrações do farneseno e incubadas novamente. As células foram então coradas pelo método Giemsa (VOLPATO *et al.*, 2018). Após contagem, o índice de sobrevivência foi estabelecido. A CI₅₀ foi determinada em relação ao controle.

Avaliação da citotoxicidade do farneseno frente à linhagem de macrófagos J774A1

A citotoxicidade em macrófagos (J774A1) foi avaliada através da metodologia de viabilidade celular por redução do MTT (VOLPATO *et al.*, 2018). A percentagem de células viáveis foi calculada em relação ao

controle e a concentração citotóxica para 50% (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão logarítmica.

Avaliação das alterações morfológicas das formas evolutivas de L. amazonensis após o tratamento com farneseno por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Os cultivos das formas de promastigotas e amastigotas foram feitos e tratados conforme as concentrações correspondentes de CI₅₀ e controle. Após, as células foram fixadas com glutaraldeído e cacodilato de sódio 0,1 M. Para o MEV, os parasitos foram aderidos em suporte com poli-L-lisina e desidratados com etanol e CO₂ e metalizadas com ouro para visualização em microscópio eletrônico (VOLPATO *et al.*, 2018). Já para o MET, os protozoários foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8%, lavadas em cacodilato de sódio e desidratadas com acetona; incluídas em resina EPON e polimerizadas. Cortes ultrafinos foram feitos e inseridos em uma grade de cobre e contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo; foram visualizados em microscópio eletrônico de transmissão (VOLPATO *et al.*, 2018).

Análise estatística

Os dados foram apresentados como média ± desvio padrão de ao menos três experimentos independentes.

Resultados e Discussão

Nos ensaios de citotoxicidade para macrófagos, realizados pelo ensaio de MTT, foi observado por meio dos valores de CC₅₀ que o Farneseno apresentou citotoxicidade de 104,67 ± 17,67 µg/mL. Já para as formas evolutivas de *L. amazonensis*, os valores obtidos de CI₅₀ foram de 24,83 e 72,66 µg/mL para promastigotas e amastigotas, respectivamente.

Ademais, os valores de índice de seletividade (que indica que a fração é X vezes mais seletiva para o protozoário do que para as células de macrófagos) foi de 4,21 para promastigotas e 1,44 para amastigotas - um valor relevante que leva a crer que pesquisas futuras para melhoria das técnicas empregadas no uso do farneseno poderiam auxiliar no uso desta substância para o tratamento contra leishmanioses. A tabela 1, a seguir, apresenta os valores obtidos nos ensaios realizados com o farneseno.

Tabela 1 - Resultados obtidos com o composto farneseno

	Macrófagos CC₅₀ (µg/mL)	Promastigotas CI₅₀ (µg/mL)	IS	Amastigotas CI₅₀ (µg/mL)	IS
Farneseno	104,67 ± 17,67	24,83 ± 4	4,21	72,66 ± 20,52	1,44

As análises referentes ao MEV e ao MET estão em andamento e em modo de finalização.

Conclusões

Com os resultados obtidos foi possível constatar que se alcançou desfechos com relevante atividade antileishmaniana *in vitro* do composto farneseno, portanto, seria boa candidata para prosseguir com mais pesquisas, as quais possibilitem a avaliação *in vivo*.

Agradecimentos

Agradeço à minha família, que sempre me deu apoio incondicional em todos os meus projetos. Ao meu orientador, professor Dr. Celso Vataru Nakamura, pela oportunidade e por todos os recursos necessários para que esse projeto fosse desenvolvido. A minha co-orientadora, Dra. Thaysa Ksiaskiewicz Karam, por todo o apoio e ajuda nas diversas atividades realizadas durante minha pesquisa. Por fim, agradeço ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de estudos que possibilitou minha dedicação ao programa.

Referências

JAFFARY F., NILFOROUSHZADEH M., SIADAT A., HAFTBARADARAN E., ANSARI N., AHMADI E. A comparison between the effects of glucantime, topical trichloroacetic acid 50% plus glucantime, and fractional carbon dioxide laser plus glucantime on cutaneous leishmaniasis lesions. **Dermatology Research and Practice**, vol. 2016, p. 6462804, 2016.

ORYAN A., BAHRAMI S., BEMANI E. Emerging role of amiodarone and dronedarone, as antiarrhythmic drugs, in treatment of leishmaniasis. **Acta Tropica**, vol. 185, p. 34-41, 2018.

SERENO D., HARRAT Z., EDDAIKRA N. Meta-analysis and discussion on challenges to translate *Leishmania* drug resistance phenotyping into the clinic. **Acta Tropica**, vol. 191, p. 204-211, 2019.

STANOJEVIC, L. P.; MARJANOVIC-BALABAN, Z. R.; KALABA, V. D.; STANOJEVIC, J. S.; CETKOVIC, D. J. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Chamomile Flowers Essential Oil (*Matricaria chamomilla* L.). **J Essent Oil Bear PI**, v. 19, p. 2017 – 2028, 2016.

VOLPATO H., SCARIOT D., SOARES E., JACOMINI A., ROSA F., SARRAGIOTTO M., UEDA-NAKAMURA T., RUBIRA A., PEREIRA G., MANADAS R., LEITÃO A., BORGES O., NAKAMURA C., SOUSA M. In vitro anti-Leishmania activity of T6 synthetic compound encapsulated in yeast-derived β -(1,3)-d-glucan particles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 119, p. 1264–1275, 1 nov. 2018.