

DELINEAMENTOS DO USO DE CÉLULAS THP-1 EM ENSAIO *IN VITRO* PARA TESTAGEM DE NOVOS COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTI- LEISHMANIA

Lais Maria Barazzetti Pereira da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Sandra Mara Alessi Aristides (Orientador), Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos-Milaré (Coorientador) e-mail: ra110876@uem.br.

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

Área e subárea: Ciências da Saúde/Farmácia/Análise e Controle de Medicamentos

Palavras-chave: Leishmaniose, THP-1, Atividade anti-*Leishmania*

Resumo:

A leishmaniose é uma doença negligenciada mundialmente. O tratamento disponível é limitado, com eficácia variável e diversos efeitos colaterais. A busca por tratamentos alternativos exige investigações de novos compostos ou a realocação dos já existentes através de estudos *in vivo* e *in vitro*. Neste trabalho, investigamos o uso das células THP-1 em ensaios *in vitro* para a testagem de diferentes compostos, os dados foram retirados de estudos disponíveis na plataforma PubMed. Além disso, foi iniciada a padronização de todas as etapas do cultivo de células THP-1 no Laboratório de Imunologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá, criando-se documentos com a descrição das atividades (POPs). Dentre os artigos elencados no levantamento bibliográfico observa-se semelhanças entre as metodologias, geralmente resultados satisfatórios foram encontrados no uso das células THP-1 como modelo para citotoxicidade. Os achados da literatura serviram de base para o desenvolvimento das atividades laboratoriais, e planejamento das próximas atividades experimentais.

Introdução

As leishmanioses possuem epidemiologia diversa e se destacam pela ocorrência em países menos desenvolvidos (BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Os antimoniais pentavalentes, a anfotericina B e suas formulações são os fármacos de uso, quase sempre tóxicos e com eficácia variável (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Portanto, novos fármacos com ação anti-*Leishmania* estão em foco, e modelos de infecção *in vitro* usando células hospedeiras específicas são habituais (DE MUYLDER, 2011). As células mielomonocíticas da linhagem THP-1 (monócitos THP-1) são exemplos de células imortalizadas amplamente utilizadas em estudos *in vitro*. Elas foram isoladas do sangue periférico de uma criança com leucemia monocítica aguda, e após diferenciação usando o forbol 12-miristato 13-

acetato (PMA) adquirem características fenotípicas e funcionais que se assemelham àquelas de macrófagos humanos primários (LUND, 2016). Objetivamos através de uma revisão de literatura buscar dados sobre o uso de células THP-1 como modelo em ensaios que buscam novos potenciais compostos com ação anti-*Leishmania*, e padronizar o uso da linhagem celular THP-1 no laboratório de Imunologia Clínica (UEM).

Materiais e métodos

Cultivo de células THP-1: células THP-1 (ATCC® TIB-202™) foram mantidas em estufa, 37 °C/5% de CO₂, em meio RPMI 1640 (Gibco®), pH 7,6 suplementado com 20% (v/v) de soro bovino fetal (SBF) inativado e antibióticos (0,063 mg/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina).

Ensaio de viabilidade: para a avaliação da viabilidade das culturas foi utilizado o azul de Trypan (0,7%); as células foram centrifugadas (1000 rpm/10 min), ressuspendidas, para posterior diluição em azul de Trypan. A análise ocorreu em microscópio óptico comum. Os ensaios de toxicidade continuam em andamento.

Estoque de células THP-1: para a criação de lotes de trabalho, as células THP-1 mantidas até estarem aptas para o congelamento em concentração de 8×10^5 células/mL em meio de cultura suplementado com 20% de SBF e 5% de (V/V) DMSO (criopreservador). Ressalta-se o uso de metodologia de congelamento lento (freezer comum (-20 °C), freezer -80 °C, nitrogênio líquido (-196 °C)) e descongelamento rápido (cerca de 2 minutos, banho-maria 37 °C).

Revisão de literatura: foi utilizada a base de dados eletrônica PubMed. MeSH (*Medical Subject Headings*) termos foram usados na recuperação dos artigos. Títulos e resumos foram analisados. Os critérios de elegibilidade foram: publicações que usam células THP-1 em ensaio de citotoxicidade para testagem de novos compostos com potenciais ações anti-*Leishmania*. Somente pesquisas originais, em inglês, e com resumo disponível foram incluídas independentemente do ano de publicação. Guidelines, revisões, cartas, editoriais, comentários, notícias, e relatos de casos não foram incluídos. Os textos completos foram recuperados em PDF para leitura na íntegra. Ao final, analisou-se os dados em tabelas. Divergências foram resolvidas por consenso.

Resultados e Discussão

Resultados laboratoriais: os resultados dos ensaios com as células THP-1 foram descritos em POPs (Procedimento Operacional Padrão) disponíveis no laboratório de Imunologia Clínica (UEM). Resumidamente, as células foram descongeladas, mantidas em ambiente adequado até o momento propício para ampliação. Os resultados de viabilidade encontrados na manipulação das células sempre atingiam um número superior a 75% de células viáveis. Foi estabelecido um limite de 10 passagens para a

realização do congelamento e estoque das células, sendo que para isso observava-se a confluência celular superior a 80%.

Resultados de revisão bibliográfica: para a busca no banco de dados PubMed utilizou-se dois blocos de Mesh Termos, bloco 1: “Leishmaniasis” or “Leishmania”; e o bloco 2: “THP-1 cells”, o resultado dessa busca foi de 50 artigos. Após a análise de títulos e resumos foram excluídos 24 artigos por não atenderem os requisitos, restando assim 26 artigos para a leitura na íntegra. Por fim, 16 artigos foram excluídos por não adequação aos critérios de elegibilidade, restando 10 estudos para a análise.

A maior parte dos artigos pertencem ao ano de 2019 (5/10)^(B, D, F, G, H), seguido por 2017 (2/10)^(A, E). O restante pertence ao ano de 2018^(J), 2020^(I) e 2021^(C). As espécies de *Leishmania* mais utilizadas, seja para realizar infecção, ou apenas o teste de citotoxicidade, foram as espécies *L. infantum* (4/10)^(B, C, D, I), *L. amazonensis* (3/10)^(D, J, H), *L. tropica* (2/10)^(A, C) e *L. donovani* (2/10)^(F, G). Também foram utilizadas as espécies *L. panamensis*^(D) e *L. braziliensis*^(D).

Na manipulação celular, os artigos que relataram os procedimentos utilizavam o meio RPMI (7/10)^(B, C, D, E, F, G, H), a maioria realizava suplementação com 10% de SBF (5/7)^(B, C, E, G, H). Sobre a viabilidade celular, apenas 3 deles^(A, F, G) fizeram a testagem antes dos experimentos, sendo que destes 2/3^(A, F) fizeram a metodologia com azul de Trypan (0,7%).

Todos os artigos fizeram o ensaio de citotoxicidade. Mais da metade (6/10)^(C, D, E, F, H, J) utilizou a metodologia MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Nos experimentos, a quantidade de células/mL variou de acordo com o estudo, porém duas concentrações foram repetidas: de 1×10^6 células/mL^(G, J) e 1×10^5 células/mL^(D, E). Para a diferenciação dos monócitos THP-1 em macrófagos, os artigos que relataram essa informação (6/10)^(A, C, D, F, G, H) foram unânimes no composto utilizado: PMA (forbol 12-miristato 13-acetato). Mudando apenas o tempo de incubação, 48 horas (2/6)^(A, G) ou 72 horas (2/6)^(C, H). Poucos estudos utilizam outro tipo celular (3/10)^(C, D, E), a maioria usou drogas de referência (8/10)^(A, B, C, E, F, G, H, J), sendo que em 5^(C, E, F, H, J) a droga foi a Anfotericina B. Apenas um estudo^(E) relatou toxicidade do composto teste para as células THP-1.

Artigos incluídos na revisão de literatura

A- AHMAD, A. et al. Synthesis of phytochemicals-stabilized gold nanoparticles and their biological activities against bacteria and *Leishmania*. Microbial Pathogenesis, v. 110, p. 304-312, 2017.

B- AL-TAMIMI, A. M. S. et al. Discovery of new organoselenium compounds as antileishmanial agents. Bioorganic Chemistry, v. 86, p. 339-345, 2019.

C- BASSANINI, I. et al. Design, Synthesis and *In Vitro* Investigation of Novel Basic Celastrol Carboxamides as Bio-Inspired Leishmanicidal Agents Endowed with Inhibitory Activity against *Leishmania* Hsp90. Biomolecules, v. 11, n. 1, p. 56, 2021.

D- BISWARO, L. S. et al. Itraconazole encapsulated PLGA nanoparticles covered with mannose as potential candidates against leishmaniasis. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, v. 107, n. 3, p. 680-687, 2019.

E- CAMPOS, F. F. et al. *In vitro* leishmanicidal, antibacterial and antitumour potential of anhydrocochliquinone A obtained from the fungus Cochliobolus sp. Journal of Biosciences, v. 42, n. 4, p. 657-664, 2017.

F- CHAUHAN, K.; KAUR, G.; KAUR, S. Evaluation of antileishmanial efficacy of Salidroside against the SSG-sensitive and resistant strain of *Leishmania donovani*. Parasitology International, v. 72, p. 101928, 2019.

G- CORMAN, H. N. et al. Development of a target-free high-throughput screening platform for the discovery of antileishmanial compounds. *International journal of antimicrobial agents*, v. 54, n. 4, p. 496-501, 2019.

H- DA SILVA, L. A. L. et al. Antiprotozoal investigation of 20 plant metabolites on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis* amastigotes. Atalantoflavone alters the mitochondrial membrane potential. *Parasitology*, v. 146, n. 7, p. 849-856, 2019.

I- GARNICA, P. et al. Pre-clinical evidences of the antileishmanial effects of diselenides and selenocyanates. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 30, n. 17, p. 127371, 2020.

J- MARTIN, E. F. et al. Prospecting for cytotoxic and antiprotozoal 4-aryl-4H-chromenes and 10-aryldihydropyrano [2, 3-f] chromenes. *Archiv der Pharmazie*, v. 351, n. 10, p. 1800100, 2018.

Conclusões

O cultivo de células THP-1 em ensaios *in vitro* se mostrou promissor após a revisão de literatura, que permitiu o aprimoramento das metodologias em desenvolvimento no laboratório de Imunologia Clínica (UEM).

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento do trabalho.

Referências

BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. 2017.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. **Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets**. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(12\)60084-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(12)60084-4)

DE MUYLDER, G. et al. **A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit**. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 5, n. 7, p. e1253, 2011.

LUND, M. E. et al. **The choice of phorbol 12-myristate 13-acetate differentiation protocol influences the response of THP-1 macrophages to a pro-inflammatory stimulus**. *Journal of Immunological Methods*, v. 430, p. 64-70, 2016.