

ATIVIDADE CITOTÓXICA DA β -LAPACHONA INCORPORADA EM PLURONICS® DE P-123 E F-127 SOBRE MACRÓFAGOS J774A.1

Maria Julia Schiavon Gonçalves (PIC/UEM), Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré (Orientadora), e-mail: acfhrmilare2@uem.br

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências da saúde/Farmácia/Análise e Controle de Medicamentos

Palavras-chave: Macrófagos, Atividade citotóxica, β -lapachona

Resumo

A leishmaniose é causada pela picada de flebotomíneos fêmeas contaminados pelo protozoário do gênero *Leishmania*. A leishmaniose tegumentar é uma doença caracterizada por lesões na pele. Esse protozoário é classificado como intracelular obrigatório, responsável por infectar células de defesa fagocitárias, os macrófagos. Essas células atuam no combate a microrganismos realizando a fagocitose e o reparo ao tecido lesado. Os fármacos atuais não apresentam uma eficácia desejada além de efeitos colaterais graves, estudos apontam que a β -lapachona e compostos nanoencapsulados podem ser promissores para um tratamento direcionado a derme. Neste trabalho investigamos a ação do composto nanoencapsulado em micelas de Pluronic® de P-123 e F-127 em macrófagos de linhagem J774A.1. Os resultados obtidos mostraram um CC_{50} igual a 0,16 μ g/mL e 0,32 μ g/ml para P-123 e F-127 incorporados a β -lapachona respectivamente, as micelas sozinhas não apresentaram nenhum efeito sobre os macrófagos de linhagem J774A.1.

Introdução

A Leishmaniose Tegumentar é causada pela picada do flebotomíneo fêmea contaminado pelo protozoário do gênero *Leishmania*. A Leishmaniose Tegumentar (LT) é caracterizada por uma ou várias lesões na pele ou mucosa, tendo uma ampla distribuição mundial e presente em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2017). A pesquisa por novos tratamentos para leishmaniose tegumentar tem se mostrado de extrema importância visto que os fármacos atuais causam efeitos colaterais graves e não apresentam uma ação totalmente leishmanicida. Visando este ponto a busca por terapias alternativas vêm crescendo, pesquisas *in vitro* realizadas pelo grupo da Imunologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá (UEM) apontam

que o composto da β -lapachona, derivado natural do lapachol o qual é extraído da casca do ipê roxo (*Tabebuia avellanedae*), pode ser promissor para o tratamento da doença.

O parasito responsável por causar a leishmaniose é intracelular obrigatório, causando uma infecção em células do sistema mononuclear fagocitário, essa infecção dificulta o efeito das drogas nas células e consequentemente na *Leishmania*. O macrófago pertence a esse sistema de células, sendo responsável por realizar a fagocitose de microrganismos e realizar o reparo de tecidos lesados, essas células são ativadas para realizarem suas funções produzindo uma resposta a infecção e lesão (ABBAS *et al.*, 2019). Nessa pesquisa o objetivo foi investigar a ação da β -lapachona incorporada em Pluronic[®] de P-123 e F-127, sobre macrófagos de linhagem J774A.1, buscando uma maior eficiência, seletividade e menor toxicidade para essas células de defesa.

Materiais e métodos

Cultivo e Verificação da viabilidade celular de macrófagos J774A.1

As células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO₂ em meio RPMI 1640 (Gibco[®]) pH 7,6 suplementado com 10%-20% de soro fetal bovino inativado e antibióticos (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas por subcultivos periódicos. Para a verificação da viabilidade celular de macrófagos J774A.1 foi utilizado o corante azul de trypan (0,7%), classificando as células azuis como inviáveis e as células incolores como viáveis.

Composto

As soluções estoques de β -lapachona incorporadas em Pluronic[®] de P-123 e F-127 foram preparadas em PBS estéril na concentração inicial de 1 mg do composto com micelas a 3%, sendo fornecidas pelo Laboratório de Química da Universidade Estadual de Maringá.

Ensaio de citotoxicidade e Análise estatística:

A atividade da β -lapachona incorporadas em Pluronic[®] de P-123 e F-127 sobre a viabilidade de macrófagos J774A.1 foi determinada pelo ensaio colorimétrico baseado na redução do XTT (2,3-bis[2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide; Sigma Co Chemical; St. Louis, MO). Durante o experimento a suspensão celular foi ajustada para 5 x 10⁵ macrófagos/mL e distribuída em uma placa de cultura de 96 poços (placa de teste TPP[™]), seguida de 48 horas de incubação para crescimento e confluência celular (5% CO₂ a 37 °C). As células que não aderiram à placa foram removidas por lavagem com meio RPMI 1640 simples. Em

seguida, o composto foi adicionado em concentrações variadas por meio de diluições na placa (50 a 0,1 $\mu\text{g/mL}$). As culturas foram incubadas por 24 horas e 37 °C em 5% de CO_2 , e células sem a adição do composto foram utilizadas como controle de viabilidade. Os resultados foram revelados pelo método colorimétrico XTT (500 mg/mL ativado com 50 mg/mL PMS, 100 μg /poço de solução). As placas foram incubadas com a solução de XTT e PMS na ausência de luz, em uma atmosfera contendo 5% de CO_2 , por 4 horas à 37 °C. Após esse período, a viabilidade celular foi determinada por espectrofotometria a 450/620 nm a partir do composto formazan formado após a redução do XTT por formas viáveis de macrófagos. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos para células não tratadas (controles). A concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi calculada pela comparação dos resultados do composto com os controles para o período de incubação estudado. O teste em placa foi realizado em quadruplicata. Os dados foram tabulados no *software* Excel.

Resultados e Discussão

As micelas são classificadas como moléculas anfipáticas quando colocadas em meio aquoso, sendo assim apresentam um sistema de distribuição de fármacos que melhora a biodisponibilidade da droga, seletividade e redução da toxicidade (OYAMA, *et al.*, 2019). Neste estudo combinamos a ação das micelas em Pluronic[®] de P-123 e F-127 com a β -lapachona, buscando uma melhora na distribuição desses fármacos, visto que estudos anteriores mostraram uma ação efetiva da β -lapachona, sendo esta menos tóxica quando comparada aos fármacos padrões, sobre macrófagos de linhagem J774A.1 (dados não publicados).

Para a realização dos experimentos foi calculado a porcentagem da viabilidade celular dos macrófagos após a adição do corante azul de trypan (0,7%) que apresenta permeabilidade em membranas não íntegras. Após as contagens das células chegamos a uma viabilidade de 80%.

Os resultados dos experimentos mostraram CC_{50} de 0,16 $\mu\text{g/mL}$ para o composto incorporado ao P-123 e uma concentração citotóxica duas vezes maior quando incorporado ao F-127, 0,32 $\mu\text{g/mL}$. Através de cálculos encontramos um valor de R^2 superior a 0,90 indicando boa reprodutibilidade dos experimentos. Por meio desses resultados podemos observar que a β -lapachona incorporada ao P-123 foi mais citotóxica aos macrófagos quando comparada ao uso do Pluronic[®] F-127 que se mostrou menos citotóxico a essas células, o que também foi observado em estudos anteriores (OYAMA *et al.*, 2019). Por ser um composto natural a β -lapachona tem se mostrado menos tóxica e agressiva as células. Os experimentos somente com as micelas de P-123 e F-127 não apresentaram atividade sobre os macrófagos.

Estudos utilizando micelas de Pluronic[®] tem mostrado efetividade com a seletividade e baixa toxicidade sobre os macrófagos (OYAMA *et al.*, 2019, SINGH *et al.*, 2017). Portanto, é de extrema importância a continuidade dos experimentos buscando resultados cada vez mais promissores.

Conclusões

Conclui-se que a β -lapachona incorporada em micelas de Pluronic[®] P-123 e F-127 apresentaram uma boa seletividade em relação aos macrófagos da linhagem J774A.1, e em baixas concentrações. Sendo que o uso do composto incorporado ao P-123 foi mais tóxico em relação ao F-127, quando testados diretamente sobre as células como ocorre no ensaio de citotoxicidade.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao pessoal do laboratório de Imunologia Clínica da Universidade Estadual de Maringá e de forma especial a minha orientadora professora Áquila, por sempre me apoiar e incentivar, muito obrigada.

Referências

ABBAS, A., LICHTMAN, A., PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 9 ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2019. cap 2.

BRASIL, **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde**. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [internet]. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 18 agosto. 2021.

OYAMA, J., LERA NONOSE, D., MILARÉ, Á., FERREIRA, F., de FREITAS, C., CAETANO, et al. Potential of Pluronic[®] P-123 and F-127 as nanocarriers of anti-*Leishmania* chemotherapy. **Acta Tropica Journal**. v. 192. p.11-21, jan, 2019.

SINGH, P. K., PAWAR, V. K., JAISWAL, A. K., SINGH, Y., SRIKANTH, C. H., CHAURASIA, M., et al. Chitosan coated PluronicF127 micelles for effective delivery of Amphotericin B in experimental visceral leishmaniasis. **International journal of biological macromolecules**. v.105. p 1220-1231, 2017.