

ATIVIDADE ANTI-*LEISHMANIA* DA β -LAPACHONA INCORPORADA EM PLURONICS® DE P-123 E F-127 CONTRA FORMAS PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

Juliane Camila Crubelati (PIC/UEM), Áquila Carolina Ramos Milaré (Orientadora), e-mail: acfhrmilare2@uem.br

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

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

Palavras-chave: *Leishmania (L.) amazonensis*, β -lapachona, Pluronic®

Resumo: Leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e endêmicas em vários países, sendo a leishmaniose tegumentar (LT) um dos subtipos mais comuns. O tratamento é baseado em fármacos que apresentam muitos efeitos tóxicos e falhas terapêuticas, portanto, com o objetivo de obter novas opções de tratamento, foram realizados ensaios *in vitro* para elucidar os efeitos da β -lapachona encapsulada em Pluronic® P-123 e F-127 sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*. A β -lapachona com Pluronic® de P-123 apresenta IC₅₀ de 0,316 ± 0,2 µg/mL, 0,206 ± 0,03 µg/mL, 0,184 ± 0,02 µg/mL em 24, 48 e 72 horas, respectivamente. A IC₅₀ da β -lapachona com Pluronic® de F-127 foram de 0,506 ± 0,2 µg/mL, 0,300 ± 0,01 µg/mL, 0,506 ± 0,06 µg/mL em 24, 48 e 72 horas, respectivamente. Com esses resultados, conclui-se que a pesquisa da atividade leishmanicida da β -lapachona constitui uma fonte promissora de possível novo tratamento para a leishmaniose.

Introdução

As leishmanioses se caracterizam por doenças parasitárias causadas por protozoários cinetoplastídeos obrigatórios do gênero *Leishmania* e tem como vetor mosquitos flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomyia* infectados com formas promastigotas do parasito. O subtipo mais comum de leishmaniose é a tegumentar (LT), causada por diferentes espécies desse protozoário, incluindo a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, no qual se caracteriza pelo aparecimento de lesões ulcerosas na pele. A LT constitui um problema de saúde pública em 85 países, distribuídos em quatro continentes (Américas, Europa, África e Ásia), com registro anual de 0,7 a 1,3 milhão de casos novos, no qual o Brasil ganha destaque (BRASIL, 2017).

As drogas de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose são os antimoniais pentavalentes como Glucantime®, entretanto esses medicamentos apresentam alta toxicidade ao paciente e diversos efeitos colaterais. Diante disso, as plantas medicinais são ótimas candidatas para

uso biológico, tendo muitas propriedades antimicrobianas, além de apresentarem menor citotoxicidade, em geral. A β -lapachona é uma o-naftoquinona obtida através do lapachol presente em plantas do gênero *Tabebuia* spp e já apresenta atividade anti-parasitária descrita na literatura (BRASIL, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2013). A investigação da β -lapachona em micelas carreadores (Pluronic[®] P-123 e F-127), que demonstraram capacidade de aumentar a solubilidade e ação do fármaco, representam o desenvolvimento de terapias que podem tornar-se efetivas (MORENO *et al.*, 2015). Portanto, o objetivo desse estudo é elucidar o efeito da β -lapachona incorporada em Pluronic[®] P-123 e F-127 contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Materiais e métodos

Preparo dos formulados

As soluções estoques de β -lapachona incorporadas em Pluronic[®] de P-123 e F-127 foram preparados 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.

Cultivo das formas promastigotas de Leishmania para o ensaio de citotoxicidade

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016) foram cultivadas a 25 °C em meio de cultura 199 (Gibco[®]) pH 7,2, suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal inativado e antibióticos (0,063 mg/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina). Os parasitos foram mantidos por subcultivos periódicos até a fase logarítmica de crescimento em meio RPMI 1640 (Sigma, St. Louis, MO, USA), pH 6,8, suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal. As culturas foram mantidas em estufa B.O.D. a 25 °C. Para os experimentos, as formas promastigotas foram ressuspensas em meio fresco e contadas em câmara de Neubauer, ajustando a concentração desta para uma suspensão de células contendo 4×10^6 promastigotas/100 μ L.

Ensaio anti-Leishmania

Suspensões contendo 4×10^6 *Leishmania*/100 μ L de *L. amazonensis* foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos incorporados em P-123 e F-127 em placas de 96 poços, essas foram incubadas a 25 °C em estufa B.O.D por 24, 48 e 72 horas. A viabilidade foi determinada em leitor de microplaca a 450/620 nm pelo método colorimétrico do XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida) e a porcentagem de inibição foi estimada por comparação com culturas controles não tratadas.

Análise estatística

Os dados foram tabulados no *software* Excel, e reportados como média e desvio padrão.

Resultados e Discussão

Através dos ensaios *in vitro* para verificar a atividade da β -lapachona incorporada em Pluronic[®] de P-123 e F-127 sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, observa-se ação leishmanicida desse composto sob as concentrações testadas nos tempos de 24, 48 e 72 horas (Figura 1).

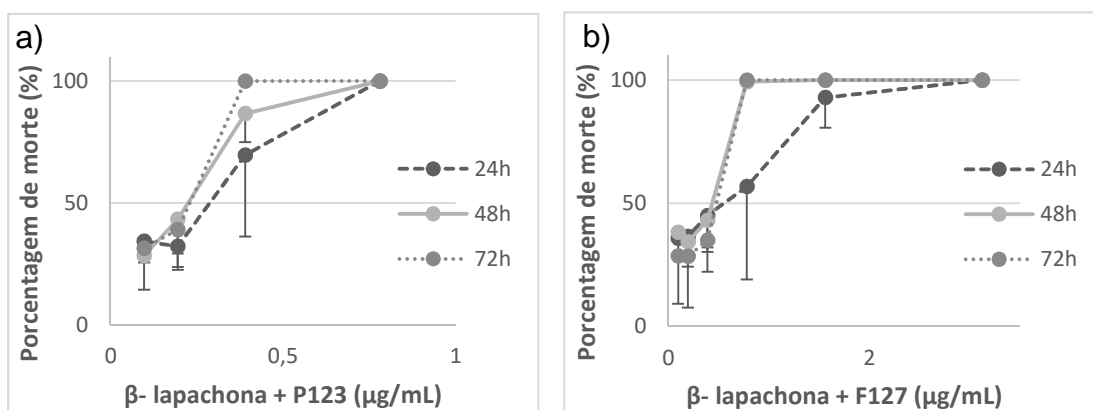


Figura 1. Representação gráfica do ensaio de citotoxicidade pelo método de redução do XTT em promastigotas de *L. amazonensis* em 24, 48 e 72 horas.

Os valores de IC_{50} da β -lapachona incorporada em Pluronic[®] de P-123 em 24, 48 e 72 horas foram de $0,316 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$, $0,206 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$, $0,184 \pm 0,02 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. Já os valores de IC_{50} da β -lapachona incorporada em Pluronic[®] de F127 em 24, 48 e 72 horas foram de $0,506 \pm 0,2 \mu\text{g/mL}$, $0,300 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$, $0,506 \pm 0,06 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. A IC_{50} da β -lapachona incorporada em Pluronic[®] de P-123 foi progressivamente diminuindo conforme o maior tempo de incubação e consequentemente de ação da droga, ou seja, existe ação leishmanicida em uma menor concentração do composto quanto maior o tempo de interação com o parasito.

Em estudos anteriores, a β -lapachona não incorporada em nenhuma nanopartícula apresentava resultados de IC_{50} de $0,65 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$, $1,24 \pm 0,19 \mu\text{g/mL}$, $0,71 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$ nos tempos de 24, 48 e 72 horas, respectivamente (DADOS NÃO PUBLICADOS). Guimarães e colaboradores também estudaram a ação da β -lapachona sobre *L. amazonensis* e a IC_{50} encontrada foi de $1.39 \mu\text{M}$ (Guimarães *et al.*, 2013). Portanto, o composto carregado pelos Pluronic[®] apresenta ação citotóxica aos parasitos em menores concentrações, segundo o ensaio realizado neste trabalho.

Um estudo *in vitro* realizado avaliando a atividade do Pluronic[®] contra *L. amazonensis* mostrou que as micelas P-123 e F-127 isoladas não apresentam efeito contra *Leishmania* considerável, sendo o P-123 mais citotóxico quando comparada ao F127 (OYAMA *et al.*, 2019). Esses resultados corroboram com o ensaio realizado nesse projeto, já que ambas

as micelas isoladas não atingiram o IC₅₀, bem como o Pluronic[®] de P-123 apresentou uma ação contra as formas promastigotas relativamente maior que Pluronic[®] de F-127. Ademais, Lage e colaboradores investigaram a atividade da molécula 8-HQN encapsulada em Pluronic[®] em amastigotas e promastigotas de *L. amazonensis* e os resultados foram melhores do que a ação do composto sozinho e que o tratamento convencional (LAGE *et al.*, 2016).

Conclusões

A β -lapachona encapsulada em Pluronic[®] P-123 e F-127 apresentou atividade anti-parasitária satisfatória contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo o P-123 relativamente mais citotóxico que F-127. Portanto, a pesquisa da atividade leishmanicida e citotóxica da β -lapachona constitui uma fonte promissora para novos tratamentos para a leishmaniose e deve ser encorajada.

Agradecimentos

Agradeço à Prof^a Áquila e à equipe do laboratório de Imunologia Clínica pelo auxílio e orientação na realização deste projeto.

Referências

BRASIL, 2017a. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde**, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana – Editora do Ministério da Saúde.

GUIMARÃES, T. T. et al. Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and -resistant *Leishmania* parasites: synthesis of novel α - and nor- α -lapachone-based 1,2,3-triazoles by coppercatalyzed azide-alkyne cycloaddition. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 63, p. 523–530, 2013.

LAGE, L. M. D. R. et al. An 8-hydroxyquinoline-containing polymeric micelle system is effective for the treatment of murine tegumentary leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 115, n. 11, p. 4083–4095, 2016.

MORENO, E. et al. Assessment of β -lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in *L. major* infected BALB/c mice. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 8, p. 2003–2012, 2015.

OYAMA, J. et al. Potential of Pluronic[®] P-123 and F-127 as nanocarriers of anti-*Leishmania* chemotherapy. **Acta Tropica**, v. 192, p. 11–21, 2019.