

EXPRESSÃO DE CITOCINAS TH1 E TH2 EM LESÕES DE CAMUNDONGOS INFECTADOS POR *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS* E TRATADOS COM ÓLEO ESSENCIAL DE *TETRADENIA RIPARIA* ASSOCIADO À ANFOTERICINA B OU CETOCONAZOL.

Antonio Henrique Pereira dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Mariana de Souza Terron-Monich, Maria Valdrinez Campana Lonardoni, 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/ Saúde Coletiva/ Saúde Pública

Palavras-chave: Leishmaniose, terapia combinada, expressão gênica

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão genica das citocinas IL-12 e IL-10 em lesões de camundongos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* tratados com óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) associado à anfotericina B (AmB) ou ao cetoconazol. As lesões dos animais infectados com 2×10^6 parasitos/ μ L e tratados com TrEO 60 mg/mL, cetoconazol 40 mg/kg e AmB 5 mg/kg/dia, de forma isolada ou combinada, e de animais infectados e não tratados, foram removidas, maceradas e o RNA extraído. A pureza e concentração do RNA das amostras foram dosadas em NanoDrop. Em seguida foi realizado o RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) para detecção da expressão do mRNA das citocinas IL-10 e IL-12. A análise semi-quantitativa da expressão foi realizada por densitometria das bandas, utilizando o *software* ImageJ. Todas as amostras de RNA apresentaram bons graus de pureza, variando de 1,83 a 2,04. Foi observado uma variação de 174 ng/mL a 646 ng/mL. Não foi observada expressão da IL-10 em nenhum dos grupos estudados. A IL-12 foi detectada apenas nos grupos tratado com cetoconazol e no grupo infectado e não tratado, porém não houve diferença significativa entre a expressão nesses grupos. Em conclusão, a expressão da IL-10 não foi estimulada em nenhum dos grupos no momento avaliado e os tratamentos utilizando TrEO e AmB tanto administrado individualmente como em combinação inibiram a expressão da citocina IL-12, em relação ao grupo infectado e não tratado.

Introdução

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença de caráter infeccioso, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A LTA acomete a pele e mucosas e as manifestações clínicas que variam de acordo com a espécie, sendo que a forma cutânea difusa, causada por *Leishmania (L.) amazonenses*. Embora seja mais rara, é muito grave. Em relação ao tratamento, são utilizados como fármacos de primeira escolha, o antimoniato e anfotericina B, assim como podem usados fármacos alternativos como o cetoconazol. Porém estes medicamentos apresentam

diversos efeitos colaterais levando a uma perda na eficácia do tratamento (PAHO, 2018). Dessa forma, torna-se necessária a busca por novos tratamentos, como aqueles utilizando plantas medicinais que apresentam menor toxicidade e custos. O óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) possui ação anti-*Leishmania* para as duas formas do parasito, promastigotas e amastigotas, além de uma importante ação imunomoduladora das respostas Th1 e Th2 (DEMARCHI, 2016). A terapia combinada se torna de grande interesse, uma vez que estudos *in vitro* com o TrEO em associação com o cetoconazol e anfotericina B mostraram efeitos aditivos e sinérgicos anti-*L. (L.) amazonensis* (TERRON, 2017). O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica das citocinas das linhagens celulares Th1 e Th2 em lesões de camundongos infectados com *Leishmania (L.) amazonensis* tratados com óleo essencial de *T. riparia* associado à AmB ou ao cetoconazol.

Materiais e métodos

Aprovação pelo comitê de ética

Os ensaios realizados no presente projeto foram aprovados conforme CEUA n. 2096250517.

Obtenção das amostras biológicas

As amostras utilizadas foram obtidas previamente e estavam armazenadas em Trizol, a - 80°C. Resumidamente, camundongos BALB/c foram infectados na pata posterior direita com 2×10^7 promastigotas /mL de *L. (L.) amazonensis* (LLa). Após o aparecimento da lesão (aprox. 30 dias), foram constituídos sete grupos com dez 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). /mL; G4) tratamento oral com cetoconazol 40 mg/kg associado ao TrEO tópico 60 mg; G5) tratamento via intraperitoneal com AmB 5 mg/kg/dia; G6) Tratamento via intraperitoneal com AmB 5 mg/kg/dia associado ao TrEO 60 µg/mL; G7) animais não infectados e não tratados (controle negativo). O tratamento foi realizado durante 30 dias, sendo o cetoconazol e a AmB 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 as lesões removidas. Essas lesões foram pesadas e, em seguida, maceradas e armazenadas em Trizol a - 80 °C.

Expressão de citocinas nas lesões

O RNA total dos macerados celulares foi obtido com TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific) de acordo com protocolo do fabricante. A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop™ Lite. A partir de RNA, foi sintetizada a primeira fita de cDNA, usando iniciadores Oligo (dT) e SuperScript® III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, foi realizada uma RT-PCR (reverse transcription polymerase chain reaction) semi-quantitativa quantificando as bandas densitometricamente usando o software IMAGEJ. Cada gene foi normalizado para GAPDH como controle interno.

Resultados e Discussão

Treze amostras foram selecionadas como representativas dos grupos para análise de pureza e concentração do RNA, para garantir a qualidade das amostras e validar o método de extração, foi possível observar que as amostras apresentaram bons graus de pureza do RNA, com uma variação de 1,83 a 2,04, enquanto a concentração do RNA das mesmas apresentou valores de 174 ng/mL a 646 ng/mL. A IL-12 foi expressa apenas nos grupos G2 (tratamento oral com cetoconazol 40 mg/kg) e G3 (G3) animais infectados e não tratados (controle positivo). A expressão do gene de GAPDH (controle interno) ocorreu em todas as amostras, validando o teste realizado (figura 1). Não houve diferença significativa na expressão de IL-12 entre os grupos 2 e 3 (dados não mostrados).

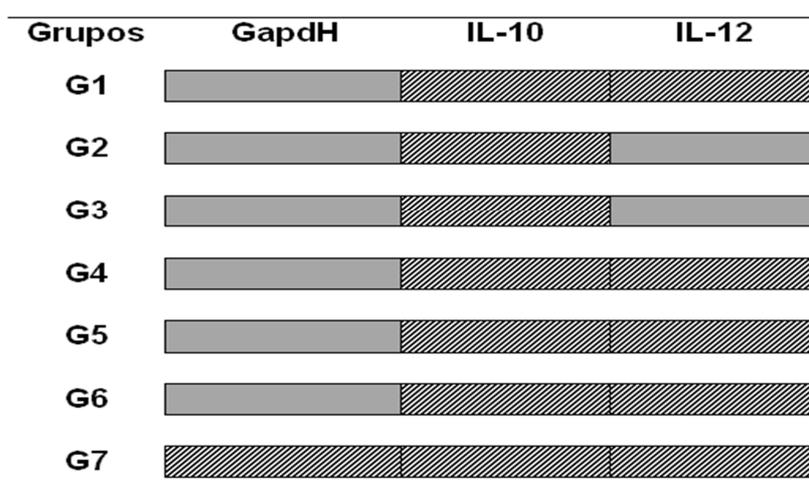


Figura 1 - Expressão de IL-10 e IL-12 pelo método de RT-PCR

Área cinza: houve expressão de mRNA por RT-PCR; Área hachurada: não houve expressão de mRNA. 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). /mL; G4) tratamento oral com cetoconazol 40 mg/kg associado ao TrEO tópico 60 mg; 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; G7) animais não infectados e não tratados (controle negativo).

A ativação de células da resposta imune celular, como os linfócitos Th1 produtores de interferon (IFN), fator de necrose tumoral (TNF) e interleucinas (IL) como IL-12, promove a ativação de macrófagos, estimulando mecanismos microbicidas e morte do parasito. Já a resposta do tipo Th2, induz as citocinas IL-10 e IL-4, e é considerada não protetora e diretamente relacionada à progressão da doença (Gollob et al. 2014).

DEMARCHI et al (2016) observaram que o TrEO é capaz de induzir um aumento da expressão de IL-12 nas primeiras horas de tratamento, bem como a inibição da expressão de IL-10. Assim, a não expressão de IL-10 em nosso trabalho pode ter ocorrido pela ação inibitória induzida pelo TrEO e AmB sobre os linfócitos TH₂. Entretanto, a citocina IL-12 também não foi expressa nos grupos tratados. Essa citocina estimula respostas pró-inflamatórias e é produzida precocemente por macrófagos, durante a fase de processamento antigênico (EBADI et al., 2014).

Diante disso, a infecção persistente, com a presença do antígeno pode explicar esse estímulo no grupo não tratado. Por outro lado, o efeito leishmanicida do TrEO pode ter contribuído com a redução da infecção por *L. (L.) amazonensis*, e assim ter reduzido o estímulo da expressão de IL-12 por macrófagos nessa fase. A avaliação da expressão e da produção dessas citocinas em diferentes tempos de infecção e do tratamento poderá identificar mais precisamente o mecanismo imunomodulador do induzido por TrEO durante o tratamento.

Conclusões

O tratamento da leishmaniose tegumentar causada pela *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com TrEO associado ou não à anfotericina B ou ao cetoconazol não modificou a expressão de IL-10 durante a infecção e inibiu a expressão de IL-12.

Agradecimentos

A Fundação Araucária, à Universidade Estadual de Maringá, ao laboratório de Imunologia Clínica, ao Prof. Jorge Juarez V. Teixeira, à Prof^a Mariana de Souza Terron-Monich, minha co-orientadora, por todo apoio e disposição.

Referências

DEMARCHI, I. G *et al.* Antileishmanial and immunomodulatory effects of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 1, p. 64–77, 2016.

EBADI P, KARIMI M; AMIRGHOFRAN Z. **Plant components for immune modulation target-ing dendritic cells: implication for therapy.** *Immunotherapy*, v. 6: 1037–1053, 2014.

PAHO. Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americass. **Informe de Leishmanioses** n^o 7, v. 1, p. 1–27, 2019.

TERRON, M. S. **Atividade anti-*Leishmania* do óleo essencial de *Tetradenia riparia* associado ao cetoconazol ou a anfotericina B, *in vitro*.** Dissertação (Mestrado) Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá. 2017.