

AVALIAÇÃO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO TRATAMENTO COMBINADO ENTRE O ÓLEO ESSENCIAL DE *Tetradenia riparia* E ANFOTERICINA B OU CETOCONAZOL SOB PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Antonio Henrique Pereira dos Santos (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Mariana de Souza Terron-Monich, Maria Valdrinez Campana Lonardon, Jorge Juarez Vieira Teixeira (Orientador), e-mail: ra110693@uem.br

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, apoptose.

Resumo

O objetivo desse trabalho foi investigar a indução de apoptose pelo óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) combinado com anfotericina B (AmB) ou cetoconazol (CETO) sob promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LLa). Os parasitos foram mantidos em meio de cultura 199, suplementado com soro fetal bovino. A avaliação da indução a apoptose foi realizada por meio do teste de fragmentação de DNA. Promastigotas de LLa foram tratadas com TrEO, CETO e AmB e também com combinações destes fármacos, na concentração equivalente a dose letal para 50% dos parasitos (DL₅₀). Ao final, comparou-se a fragmentação de DNA dos parasitos tratados e não tratados e do controle de fragmentação. A dosagem de DNA nas amostras (com Nanodrop) mostrou pureza de 1,44 a 1,98, e concentrações de 290 ng/μL a 937,5 ng/μL. As amostras tratadas com TrEO, CETO e AmB sozinhas ou em combinação apresentaram indícios de fragmentação do DNA. Entretanto, o padrão de corrida dos tratamentos e controle positivo de fragmentação não se diferenciaram do controle negativo, indicando uma possível limitação da técnica. Assim, são necessários novos estudos, utilizando outros protocolos ou metodologias a fim de elucidar a ocorrência do fenômeno de apoptose induzida pelo óleo essencial de *T. riparia* combinado com anfotericina B ou cetoconazol em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

Introdução

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, amplamente distribuída e considerada um problema de saúde pública mundial. A doença pode acometer a mucosa e pele, de forma localizada ou difusa, sendo a última a forma mais grave causada pela espécie *L. (L.) amazonensis*. O tratamento da doença é realizado por fármacos como o antimoniato de meglumina e anfotericina B, além de fármacos alternativos como o cetoconazol. Entretanto, estes fármacos apresentam alta toxicidade e uma

consequente falha terapêutica. (BRASIL, 2021). Diante disso, a pesquisa de alternativas para um tratamento menos tóxico e mais eficaz é importante. A utilização de plantas medicinais, como o óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO), apresentou ação anti-*Leishmania* para as duas formas do parasito, promastigota e amastigota (DEMARCHI, 2015). Além disso, a terapia combinada entre fármacos também tem se mostrado promissora, como mostram estudos *in vitro* utilizando o TrEO em associação com o cetoconazol e anfotericina B sugerindo efeitos aditivos e sinérgicos anti-*L. (L.) amazonensis*. Entretanto, o mecanismo de ação dessas combinações, que levam à morte dos parasitos, ainda não está claro. Desse modo, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ocorrência do mecanismo de apoptose induzida pelo óleo essencial de *T. riparia* combinado com anfotericina B ou cetoconazol para formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Materiais e Métodos

Manutenção de culturas

Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016) foram cultivadas a 25°C em meio de cultura 199 (Life Technologies, EUA), pH 7,2, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Life Technologies, EUA), 2,2 g/L de NaHCO₃, 0,063 g/L penicilina (Sigma-Aldrich Chemie) e 0,1 g/L sulfato de streptomycin (Sigma Chemical Co, EUA) e mantidas por repiques semanais.

Estudo dos mecanismos de apoptose

Promastigotas de LLa (1x 10⁷ parasitos/mL) foram tratadas com a dose letal para 50% dos parasitos (DL50) dos fármacos e suas combinações: G1, tratamento com TrEO 0,05 µg/mL; G2, tratamento com cetoconazol 15 µg/mL; G3, tratamento com anfotericina B 0,04 µg/mL; G4, tratamento com TrEO 0,05 µg/mL associado a cetoconazol 15 µg/mL; G5, tratamento com TrEO 0,05 µg/mL associado a anfotericina B 0,04 µg/mL e o controle positivo de fragmentação (tratamento dos parasitos com peróxido de hidrogênio). Como controle negativo foi utilizada uma cultura de parasitos não tratados. Todas as culturas foram incubadas por 24 horas, e em seguida foram centrifugadas e quantificadas com o auxílio de câmara de Neubauer. A viabilidade dos parasitos foi considerada aceitável entre 40% e 60% de inibição. Após a contagem os parasitos foram colocados em uma solução de digestão para extração do DNA utilizando fenol/clorofórmio, e posteriormente a quantidade de DNA foi dosada por meio do NanodropTM. Por fim, a revelação da fragmentação do DNA foi realizada em gel de agarose.

Resultados e Discussão

Após o processo de extração, as amostras foram dosadas em NanodropTM para a quantificação do DNA total das amostras, tanto integro como fragmentado, apresentando pureza e concentrações de acordo com a tabela 1. A eletroforese em

gel de agarose para a identificação da fragmentação de DNA mostrou que as amostras com tratamentos apresentaram indícios de fragmentação, o que poderia indicar que a indução de apoptose é um dos mecanismos de ação tanto na monoterapia como na combinação (Figura 1).

Tabela 1 – Pureza e Concentração de DNA

Grupos	Pureza	Concentração (ng/ uL)
Controle negativo	1,98	937,5
Controle positivo	1,60	290
TrEO	1,45	392,2
Ceto	1,53	412,1
Anfotericina B	1,44	742,6
TrEO + Cetoconazol	1,64	387,6
TrEO + Anfotericina B	1,59	416,3

Entretanto, a separação destes fragmentos em gel de agarose não mostrou definição. Isto pode estar relacionado a fatores como a concentrações de agarose e também com as configurações elétricas diferentes no processo da eletroforese, podendo ser uma limitação da técnica (MATASSOV, 2004).

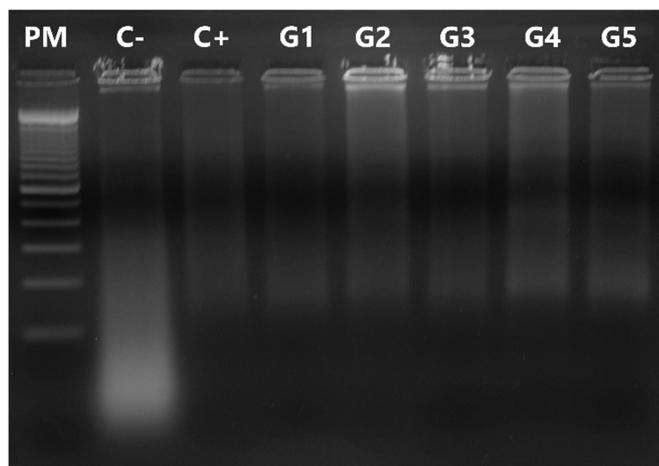


Figura 1 – Eletroforese em gel agarose

Além disso, também não foram observados os aspectos característicos do processo de fragmentação tanto no controle positivo como no negativo, como a banda única no controle negativo, que comprova a integridade do DNA, a banda em aspecto de escada no controle positivo o que confirmaria a fragmentação desse material genético. O fenômeno observado pode ter ocorrido devido a uma lise descontrolada e completa do DNA (MATASSOV, 2004). DEMARCHI et al. (2015) mostraram, por microscopia eletrônica, que o TrEO induz a destruição da membrana do parasito, bem como autofagia, visto que foram observadas alterações estruturais como intensa vacuolização do citoplasma, formação de bolhas na membrana, condensação de cromatina como também fragmentação nuclear. O cetoconazol

induziu inibição concentração-tempo dependente em *LLa*, com danos estruturais, interferências na atividade mitocondrial, formação de vacúolos autofágicos e também indução a morte por apoptose, como demonstrado por microscopia eletrônica de transmissão (NUNES, 2022). Em *Leishmania donovani* a anfotericina B lipossomal alterou inúmeras características citoplasmáticas, nucleares e de membrana, como encolhimento celular, fragmentação de DNA e disfunção mitocondrial nos parasitos, fatores que podem contribuir para a indução de morte celular semelhante a apoptose (SHADAB, 2017).

Conclusões

Neste estudo não foi possível comprovar a indução do mecanismo de morte celular semelhante a apoptose pelo óleo essencial de *T. riparia* combinado com anfotericina B ou cetoconazol em promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Indícios desse mecanismo são relatados em outros estudos, portanto, são necessárias a aplicação de outras técnicas ou metodologias para elucidar estes mecanismos de ação do TrEO, AmB, Ceto e suas combinações em *LLa*.

Agradecimentos

Ao CNPq, à Universidade Estadual de Maringá, ao laboratório de Imunologia Clínica, ao Prof. Jorge Juarez Vieira Teixeira, por todo apoio e disposição.

Referências

- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Secretaria de Vigilância em Saúde**. 2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br>>. Acesso em: 20 ago 2022.
- DEMARCHI, I. G. *et al.* **Immunomodulatory activity of essential oil from *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd in murine macrophages**. Flavour and Fragrance Journal, v. 30, n. 6, p. 428–438, 2015.
- MATASSOV, D *et al.* **Measurement of apoptosis by DNA fragmentation**. Methods in molecular biology. v. 282, p. 1–17, 2004.
- NUNES, D. C. O. S. *et al.* **Mitochondrial dysfunction on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* induced by ketoconazole: insights into drug mode of action**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 117, 2022.
- SHADAB, Md *et al.* **Apoptosis-like cell death in *Leishmania donovani* treated with KalsomeTM10, a new liposomal amphotericin B**. PloS one, v. 12, n. 2, 2017.