

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DA N-ACILHIDRAZONA BH7 ASSOCIADA A MILTEFOSINA CONTRA *Leishmania infantum*

Maria Eduarda Passos Galacini (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Nicoli Benites Enciso, Rodolfo Bento Balbinot, Celso Vataru Nakamura (Orientador).
E-mail: cvnakamura@gmail.com

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

Ciências da Saúde/ Microbiologia/ Microbiologia Aplicada

Palavras-chave: Leishmaniose; Estresse oxidativo; Combinação de compostos;

RESUMO

A leishmaniose é uma doença causada pelo protozoário *Leishmania*, transmitida por flebotomíneos e com diversas manifestações clínicas. O tratamento principal usa antimoniais pentavalentes, que têm alta toxicidade e eficácia variável. Há buscas por novos fármacos menos tóxicos e mais eficazes, como a combinação de substâncias para reduzir doses e efeitos adversos. O objetivo deste estudo é avaliar a eficácia do composto N'-[(E)-(5-nitrofurano-2-il) metilidenoamino] benzamida (BH7), isolado e combinado com Miltefosina, contra *Leishmania infantum*. Nos resultados obtidos a partir da atividade antiproliferativa com a substância isolada (BH7) frente à promastigotas de *L. infantum*, ocorreram mudanças estruturais nos parasitos, como o arredondamento do corpo celular. Também foi possível detectar espécies reativas de oxigênio (ERO), e, ainda, calcular seu CI_{50} , que teve um valor igual a 1,67 μM , apresentando uma potente atividade antiparasitária. No experimento em que foi realizado a combinação dos compostos, sendo o intuito principal o sinergismo dessas substâncias, foi possível analisar tal interação, também frente às promastigotas de *L. infantum*, e calcular o CI_{50} , em associação e separadamente. Seus valores foram iguais a $21,50 \pm 1,61 \mu M$ e $7,59 \pm 1,45 \mu M$ da Miltefosina sozinha e em combinação, respectivamente, e $0,92 \pm 0,04 \mu M$ e $0,61 \pm 0,12 \mu M$ da BH7 sozinha e em combinação, respectivamente.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que pertencem ao grupo Kinetoplastida. Essa parasitose é transmitida aos mamíferos através da picada do mosquito flebotomíneo fêmea. Os protozoários têm duas formas evolutivas principais: promastigotas flageladas, formas infecciosas encontradas no intestino do mosquito, e amastigotas intracelulares, localizadas nos macrófagos do hospedeiro mamífero. As manifestações clínicas da leishmaniose incluem lesões na pele, mucosa, e aumento de órgãos como o baço, sendo classificadas em três formas principais: cutânea, mucocutânea e visceral, com a última sendo a mais grave (Bhattacharya et al, 2020; Sundar; Singh 2018). O tratamento para a leishmaniose continua sendo os antimoniais pentavalentes, porém, apresentam baixa eficácia e muitos efeitos colaterais. Por isso, a busca por

novos tratamentos é essencial, e uma das abordagens promissoras é a combinação de substâncias para aumentar a eficácia e reduzir a toxicidade. As N-acilhidrazonas surgem como uma classe de estruturas químicas promissoras para o desenvolvimento de novos medicamentos, já que estudos indicam que esses compostos podem inibir proteases de cisteína, que são essenciais para várias funções metabólicas dos parasitos (Secoli, 2001; Duarte et al., 2007; Siqueira Neto et al., 2018). Com base nisso, o objetivo deste estudo foi investigar as atividades antiparasitárias e o efeito combinatório da BH7 com miltefosina, em formas promastigotas de *L. infantum*, visando entender melhor o seu potencial terapêutico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultivo de células e obtenção dos compostos.

As formas promastigotas de *L. infantum* (GCAM/BR/97/P142) foram cultivadas em meio Warren, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Macrófagos da linhagem J774A.1 (Banco de Células do Rio de Janeiro) foram cultivados em meio RPMI-1640, acrescido de 10% SFB, mantidos em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Miltefosina foi adquirida da empresa Cayman Chemical (Michigan, EUA). O composto N'-[(E)-(5-nitrofurano-2-il) metilidenoamino] benzamida (BH7), sintetizado pelo grupo da Prof.^a Dr.^a Vanessa Guimarães Alves, do IFPR, foi cedido ao LITFaC para avaliação de seu potencial biológico.

Atividade antiproliferativa e citotoxicidade composto BH7

Promastigotas de *L. infantum* (10⁶ células/mL) foram cultivadas em meio Warren com 10% de SFB e expostas a concentrações crescentes de BH7 em placas de 96 poços. Após 72 h de incubação, os parasitos foram fixados em formalina e contados em câmara de Neubauer. A porcentagem de inibição foi calculada e comparada com os controles sem tratamento, para determinação da concentração inibitória de 50% dos parasitos (CI₅₀) por regressão não-linear. Para avaliação da citotoxicidade, utilizou-se macrófagos J774A.1, na concentração de 5×10⁵ células/mL, as células foram adicionadas em placa de 96 poços e incubada por 24 h, a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, os tratamentos foram realizados nas concentrações crescentes de BH7, incubados por 48 h a 37 °C e 5% de CO₂. A viabilidade celular foi determinada a partir do ensaio MTT. A concentração citotóxica para 50% dos macrófagos (CC₅₀) foi calculada utilizando regressão não linear.

Alterações morfológicas com a substância isolada

Formas promastigotas de *L. infantum* (1×10⁶ células/mL) foram tratadas com BH7 nas concentrações de CI₅₀ e 2×CI₅₀ por 72 h. As células foram coletadas, lavadas com PBS e fixadas com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio, depois aderidas a lamínulas de vidro. Após desidratação em etanol, foram submetidas ao ponto crítico, metalizadas com ouro e visualizadas em MEV Quanta 250 (FEI).

Espécies reativas de oxigênio com a substância isolada

A detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) foi realizada com o marcador H₂DCFDA. Promastigotas foram tratadas por 24 h com BH7 nas concentrações de

Cl₅₀ (1,67 µM) e 2×Cl₅₀ (3,34 µM), lavadas, e incubadas com H₂DCFDA (10 µM) por 45 min a 25 °C. O H₂O₂ (1 mM) foi utilizado como controle positivo. A análise dos resultados foi feita em espectrofluorímetro (Victor X3, PerkinElmer) e a fluorescência foi medida nos comprimentos de onda de excitação de 490 nm e emissão de 535 nm.

Avaliação do efeito combinatório de BH7 com Miltefosina

Promastigotas de *L. infantum* (1×10⁶ células/mL) em meio Warren, suplementado com SFB a 10%, foram dispensadas em placa de 96 poços em concentrações crescentes de BH7 e Miltefosina (isolados e em combinação) em modelo de *checkerboard*. Após 72 h de incubação, os parasitos foram fixados em formalina e contados em câmara de Neubauer, determinando o Cl₅₀, o índice de concentração inibitória fracionária (FICI) e o índice de redução de dose (DRI). O FICI foi calculado fazendo a divisão do Cl₅₀ de cada substância em combinação pelo Cl₅₀ da substância isolada. Já o DRI foi calculado a partir do somatório da razão entre Cl₅₀ combinado por Cl₅₀ sozinho de cada uma das substâncias. Foi construído um gráfico de isoblograma utilizando as concentrações das combinações que atingiram 50% de inibição a fim de evidenciar o efeito da combinação das substâncias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O experimento antiparasitário com a substância BH7 isolada, apresentou uma potente atividade contra as promastigotas de *L. infantum*, tendo um valor de Cl₅₀ de 1,67 ± 0,22 µM. Já quando avaliada a citotoxicidade frente aos macrófagos o valor de CC₅₀ obtido foi de 55,37 ± 8,64 µM. Desta forma o BH7 apresentou um índice de seletividade (CC₅₀/Cl₅₀) de 33,15 vezes, indicando que essa substância é 33 vezes mais seletiva para combater o protozoário do que a célula hospedeira.

Diante do experimento com a BH7 isolada, nas concentrações do Cl₅₀ (1,67 µM), foram visualizadas alterações morfológicas nas promastigotas de *L. infantum* em MEV. As alterações observadas no corpo celular foram de redução e arredondamento e perda de flagelo. Para a avaliação da produção de ERO nas promastigotas de *L. infantum*, foi utilizado o marcador H₂DCFDA, que, quando convertido em H₂DCF pelas esterases, é oxidado pelas ERO, dando origem a uma molécula fluorescente (DCF). A fluorescência emitida é proporcional à quantidade de ERO presentes na célula. Assim, foi possível detectar aumentos na produção ERO de 60% e 116% nas concentrações de Cl₅₀ e 2×Cl₅₀, respectivamente.

Na associação dos compostos, seus valores de Cl₅₀ foram calculados sozinhos e em associação, tendo um valor de 21,50 ± 1,61 µM e 7,59 ± 1,45 µM da Miltefosina sozinha e em combinação, respectivamente, e um valor de 0,92 ± 0,04 µM e 0,61 ± 0,12 µM da BH7 sozinha e em combinação, respectivamente. Com os valores de Cl₅₀ definidos foi possível calcular o FICI, sendo obtido o valor de 1,01 ± 0,19, que indica aditividade na combinação das duas substâncias. No DRI, obtivemos um valor de 4,46 ± 0,79, resultando numa possível redução de 4 vezes a dose necessária para inibir o crescimento parasitário se comparado com as substâncias isoladas.

Essas informações também foram evidenciadas por meio do isoblograma, onde as concentrações de BH7 e miltefosina, em combinação, margeiam a linha aditividade.

CONCLUSÕES

Dada a escassez de tratamentos eficazes e seguros para a leishmaniose visceral, investigamos a substância BH7, derivado de N-acilhidrazona, contra promastigotas de *L. infantum*. A substância BH7 mostrou atividade antiproliferativa promissora contra promastigotas de *L. infantum*, podendo ser observado a perda de flagelo e alteração na forma celular, além de aumento na produção de ERO, contribuindo para a morte do parasito. Em combinação com miltefosina, BH7 revelou um efeito aditivo, reduzindo a dose necessária para inibir 50% dos protozoários, o que pode diminuir os efeitos tóxicos da miltefosina. A substância BH7 mostra potencial para tratar a leishmaniose, mas são necessários mais estudos para entender seu mecanismo de ação e confirmar sua eficácia em modelos clínicos.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Araucária, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico Tecnológico (CNPq), à Universidade Estadual de Maringá (PIBIC) e Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

BHATTACHARYA, A.; CORBEIL, A; DO MONTE-NETO, R. L; FERNANDEZ-PRADA, C. Of Drugs and Trypanosomatids: New Tools and Knowledge to Reduce Bottlenecks in Drug Discovery. **Genes (Basel)**. v. 11(7):722, 2020.

DUARTE, C. D.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M. Privileged structures: a useful concept for the rational design of new lead drug candidates. **Mini ver Med Chem**. v. 7(11), p. 1108-1119, 2007.

SECOLI, S. Interações medicamentosas: fundamentos para a prática clínica da enfermagem. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 35, n. 1, p. 28-34, 2001.

SIQUEIRA-NETO, J. L.; DEBNATH, A.; MCCALL, L. I.; BERNATCHEZ, J. A.; NDAO, M.; REED, S. L.; ROSENTHAL, P. J. Cysteine proteases in protozoan parasites. **PLoS Negl Trop Dis**, 12(8), e0006512, 2018.

SUNDAR, S; SINGH, B. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. **Expert Opin Ther Targets**. 22(6): 467-486, 2018.