

USO DA CITOMETRIA DE FLUXO PARA AVALIAR A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) EM CULTURAS DE *L. AMAZONENSIS* TRATADAS COM B-LAPACHONA

Bianca Celin Possari (PIBIC/UEM), Vanderlei Rezende Junior, Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera-Nonose, Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré (Coorientadora), Maria Valdrinez Campana Lonardoni (Orientadora). E-mail: mvclonardoni@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises clínicas e Biomedicina, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde, Farmácia/Farmacognosia.

Palavras-chave: *Leishmania*. Espécies Reativas de Oxigênio. Citometria de fluxo.

RESUMO

As leishmanioses são antroponoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania spp.*, transmitidos pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas que inoculam as formas promastigotas no hospedeiro. O tratamento atual, baseado em antimoniais pentavalentes e anfotericina B (AmB), é eficaz, mas associado a diversos efeitos colaterais. A β -lapachona (β -lap) tem mostrado potencial anti-*Leishmania*, sobretudo por induzir estresse oxidativo. Assim, este projeto utilizou a citometria de fluxo para avaliar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em culturas de *L. amazonensis* tratadas com β -lap, além de testar diferentes concentrações da associação entre β -lap e AmB, visando explorar uma possível terapia combinada. Os resultados apontaram a β -lap como um composto capaz de induzir alterações REDOX em *L. amazonensis*. Ademais, quando associada a AmB, observa-se efeito sinérgico e níveis expressivos de EROs, possivelmente relacionado à capacidade da AmB em comprometer a membrana do parasito, o que pode ampliar a atividade antiparasitária da combinação, refletindo um bom desempenho por meio da indução de estresse oxidativo.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são doenças infecciosas, não contagiosas, causadas por parasitos do gênero *Leishmania*. As formas clínicas são a tegumentar (LT) e a visceral (LV). A forma tegumentar caracteriza-se principalmente por lesões ulcerativas que deixam cicatrizes permanentes. Já a visceral caracteriza-se por ser uma doença sistêmica que acomete vários órgãos internos (BRASIL, 2017). O protocolo primário para o tratamento da leishmaniose baseia-se na administração de antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), cujo nome comercial é Glucantime®. Em casos

de manifestações clínicas graves ou contraindicações específicas, utiliza-se a anfotericina B (AmB). No entanto, a abordagem farmacológica atual está associada a limitações como taxas significativas de falha terapêutica e alta toxicidade sistêmica (BRASIL, 2017).

Nesse contexto, a busca por terapias alternativas com menores efeitos adversos vêm sendo amplamente estudada. As quinonas, como a β -lapachona (β -lap) são compostos de origem natural que geram espécies reativas de oxigênio (EROs). Esse processo ocorre quando o núcleo quinônico sofre biorredução por enzimas celulares, formando intermediários instáveis chamados semiquinonas. As semiquinonas transferem elétrons para o oxigênio molecular, resultando na formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), contribuindo para o estado de estresse oxidativo (COSTA, 2011). Considerando o potencial da β -lap como agente anti-*Leishmania* (RAMOS-MILARÉ, 2023), o objetivo deste projeto é a avaliação da produção de EROs em culturas de *L. amazonensis* tratadas com β -lap, AmB em diferentes concentrações de ambos os fármacos, avaliando-se o estresse oxidativo.

MATERIAIS E MÉTODOS

A β -lap e a AmB utilizadas neste estudo foram adquiridas comercialmente, sendo β -lap ($\geq 98\%$ de pureza, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e AmB (Inlab, BR, 871455), (Cristália, BR, 17119384). Promastigotas de *L. amazonensis* (cepa PH8) foram mantidas até a fase *log* de crescimento em de cultura 199. Para estimar os níveis de EROs, foi utilizado um citômetro de fluxo (BD *FacsCalibur*) e a sonda permeante de células 2',7'-dichlorodi-hidrofluoresceína diacetato (H_2DCFDA , Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) como marcador. A H_2DCFDA é um corante não fluorescente que é convertido em DCF (2',7'-diclorofluoresceína) fluorescente na presença de oxidantes adequados no interior das células, e sua intensidade pode ser detectada utilizando-se laser de 488 nm para excitação e 535 nm para detecção (CHANG, 2013).

Para essa avaliação, foi testado a IC_{50} dos fármacos isolados (1,4 $\mu g/mL$ para a β -lap e 1 $\mu g/mL$ para a AmB). A interação farmacológica entre ambos compostos foi avaliada pelo método de *checkerboard* bidimensional, no qual a matriz gerada permitiu identificar efeito sinérgico na proporção 4:5 (AmB: β -lap, $\mu g/mL$). Nessa proporção, foram testadas as concentrações correspondentes à IC_{50} (0,259 $\mu g/mL$), IC_{75} (0,399 $\mu g/mL$) e $2 \times IC_{50}$ (0,519 $\mu g/mL$). Os controles positivos foram células incubadas com H_2O_2 a 500 μM e os controles negativos não foram tratados. A fluorescência da sonda foi detectada no filtro FL1-H (530 nm) com excitação a 488 nm e analisados por meio do *software CellQuest Pro*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os níveis de fluorescência de cada grupo experimental foram medidos em comparação ao controle negativo, que representa os níveis basais de EROs

produzidos pelas formas promastigotas. O controle positivo apresentou um expressivo deslocamento à direita em FL1-H, indicando aumento dos níveis de fluorescência e evidenciando a produção de EROs (Figura 1).

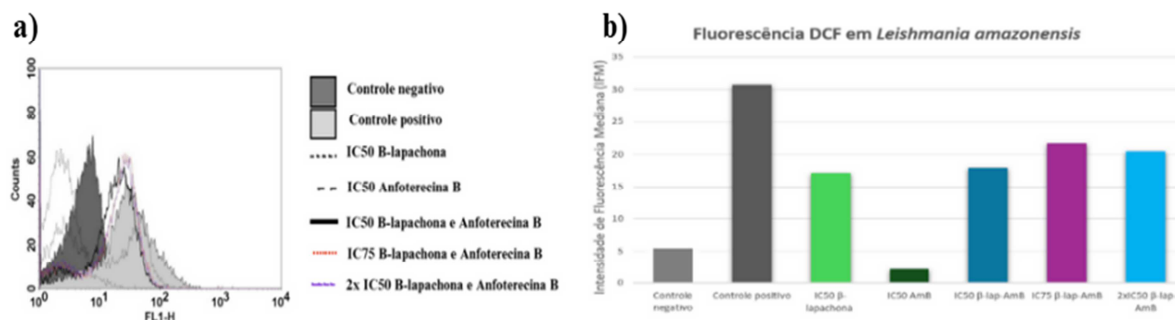


Figura 1. Análise de estresse oxidativo em *Leishmania amazonensis* por citometria de fluxo (excitação a 488 nm; emissão detectada no canal FL1-H, 530/30 nm) utilizando a sonda fluorescente 2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H₂DCFDA). **a)** Histogramas de fluorescência (FL1-H) de células não tratadas (controle negativo), células tratadas com H₂O₂ (controle positivo), fármacos isolados (IC₅₀ da β -lapachona e IC₅₀ de Anfotericina B) e para a combinação na proporção 4:5 (AmB: β -lap) na IC₅₀, IC₇₅ e 2xIC₅₀. **b)** Intensidade de fluorescência mediana (IFM) para as mesmas condições, mostrando aumento de EROs intracelular em resposta aos tratamentos.

Nos grupos tratados, o IC₅₀ da AmB apresentou um leve deslocamento para a esquerda em relação ao controle negativo, indicando que o fármaco não induz produção de EROs e mantém os níveis de fluorescência próximos ou ligeiramente abaixo do basal. Esse achado está condizente com estudos prévios, uma vez que o mecanismo de ação da AmB está relacionado principalmente à sua ligação ao ergosterol na membrana do parasita, e não à indução direta de estresse oxidativo (ALONSO, 2021). Já o tratamento com o IC₅₀ da β -lap mostrou um deslocamento mais acentuado à direita refletindo uma maior produção de EROs. Esse perfil aponta a β -lap como um composto capaz de induzir alterações REDOX em *Leishmania*, como já descrito (RAMOS-MILARÉ, 2023).

Os grupos tratados com a combinação de ambos os fármacos na proporção 4:5, pode-se notar que o nível de produção de EROs se assemelha ao IC₅₀ da β -lap isoladamente, embora o IC₇₅ e 2xIC₅₀ da combinação apresentem um deslocamento a direita ligeiramente maior (Figura 1). Logo, sugere-se que a β -lap no IC₅₀ (1,4 μ g/mL) induziu níveis de EROs semelhantes aos da combinação AmB: β -lap, mesmo quando a sua concentração estava quase dez vezes mais baixa (0,144 μ g/mL). Isso indica que a AmB apesar de não induzir EROs diretamente, pode potencializar o efeito da β -lap, seja alterando a permeabilidade de membrana do parasito ao ligar-se ao ergosterol ou facilitando sua atividade antiparasitárias.

CONCLUSÕES

Este estudo identificou que o composto β -lapachona induz maiores níveis de EROs e que, embora o IC₅₀ da anfotericina B tenha induzido pouca produção desses

radicais, sua combinação com a β -lapachona resulta num efeito sinérgico para a ativação do estresse oxidativo.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá pela bolsa concedida e apoio financeiro, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro e à Profa. Dra. Patrícia de S. B. de Mendonça do Laboratório de Micologia Médica UEM pela colaboração no uso do citômetro de fluxo.

REFERÊNCIAS

ALONSO, L; et al. Comparative EPR spectroscopy analysis of amphotericin B and miltefosine interactions with *Leishmania*, erythrocyte and macrophage membranes. **European journal of pharmaceutical sciences**. v. 163, p. 105859, jan. 2021. doi: 10.1016/j.ejps.2021.105859. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33894283/>. Acesso em 28 agosto 2025.

BRASIL. Ministerio da Saúde. Secretaria Executiva. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Brasil. Fundação Nacional de Saúde, 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 28 agosto 2025.

CHANG, H; et.al. Flow Cytometric Detection of Reactive Oxygen Species. **Bio-protocol**, v. 3, n. 8, e431, 2013. DOI: 10.21769/BioProtoc.431. Disponível em: <https://bio-protocol.org/en/bpdetail?id=431&type=0>. Acesso em: 28 agosto 2025.

COSTA, C.O. **UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS -UFAL**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.repositorio.ufal.br/bitstream/riufal/2238/1/Estudos%20bioeletroqu%C3%ADmicos%20de%20quinonas.pdf>. Acesso em: 28 agosto 2025.

RAMOS-MILARÉ, Á.C.F.H; et.al. *In vitro* effects of lapachol and β -lapachone against *Leishmania amazonensis*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 56, 1 jan. 2023. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37255095/>. Acesso em 28 agosto 2025.