



Ensaio de viabilidade celular de promastigotas de *Leishmania*  
(*Viannia*) *braziliensis* frente a compostos derivados da planta  
*Artemisia annua* L.: Acetato de  
diidroartemisinina e Ácido artesúnicico metilado

LANNARA ANGEL REIS FIGUEIREDO

## **Identificação**

**Projeto:** Ensaios de viabilidade celular de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* frente a compostos derivados da planta *Artemisia annua* L.: Acetato de diidroartemisinina e Ácido artesúnicos metilado

**Bolsista:** Lannara Angel Reis Figueiredo

**Orientador:** Profo Dr Danilo Ciccone Miguel

**Coorientador:** Doutoranda Nathalia Grazzia

**Local de execução:** Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP

## **1. Introdução**

### **1.1 A doença**

A leishmaniose é uma das doenças mundialmente negligenciadas causada por parasitas do gênero *Leishmania*. A *Leishmania (V.) braziliensis* é uma das espécies incriminadas como agente etiológico da Leishmaniose Tegumentar (LT) muito recorrente no Brasil e em outros países da América Latina. A leishmaniose tegumentar causada pela *Leishmania (V.) braziliensis* pode evoluir, em 5% dos casos, para LT mucocutânea onde há comprometimento de mucosas oronasais, podendo então levar o paciente a óbito (COSTA et al, 1990).

A leishmaniose é transmitida pelo inseto vetor denominado flebotomíneo que realiza repasto sanguíneo em um mamífero infectado, podendo ser roedores, cachorros e humanos, por exemplo, tomando para si as formas amastigotas (forma do parasita com flagelo reduzido) que se encontram geralmente dentro de macrófagos. Dentro do inseto vetor, essas formas amastigotas passam por mudanças morfológicas e tornam-se promastigotas (forma do parasita com flagelo evidente), se multiplicam e são inseridos em um novo hospedeiro quando o inseto vetor fizer um novo repasto sanguíneo.

No que diz respeito ao tratamento da leishmaniose em suas diversas formas, não existem alternativas medicamentosas ideais por diversos fatores, como o alto custo associado à terapia, a restrição de vias de administração (resumindo-se em muitos casos à via parenteral no tratamento de escolha) e a elevada toxicidade dos fármacos atualmente utilizados como insuficiência renal e hepática, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade.

### **1.2 A artemisinina e seus derivados**

A artemisinina é extraída da planta *Artemisia Annua* L. no CPQBA-Unicamp, local onde também são sintetizados seus derivados. Derivados estes que já são utilizados para tratamento de da malária, em forma de ácido artesúnicos ou artesunato de sódio. A artemisinina apresenta em sua estrutura química um grupo endoperóxido essencial na sua atividade antimalárica e esquistossomicida. Trata-se de um fármaco bem tolerado pelos pacientes por apresentar baixa toxicidade tornando-o mais interessante para ser redirecionado ao tratamento de outras doenças. O Reposicionamento de fármacos consiste em usar fármacos já conhecidos no mercado da indústria farmacêutica para outras doenças que não sejam aquelas que já são empregados, sendo interessante por já ser conhecido sua tolerância e toxicidade no público alvo de escolha para o tratamento.

### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Cultura de Promastigotas

As culturas de promastigotas do parasito *Leishmania (V.) braziliensis* foram mantidas em frascos plásticos de 25 cm<sup>2</sup> em 5 a 10 mL de meio de cultura 199 (Sigma-Aldrich) suplementadas com 5% de penicilina/estreptomicina, 0,1% de hemina, 10mM de adenina, soro fetal bovino a 10% e urina masculina filtrada à 2%. Os frascos foram armazenados em estufa de 26o e repiques foram realizados quando necessário.

#### 3.2 Preparo das soluções-estoque

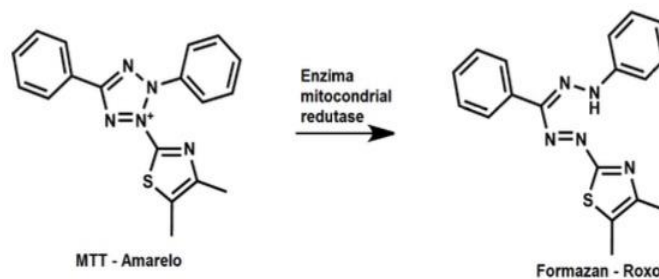
A solubilização das amostras foi feita com solvente estéril dimetilsulfóxido, DMSO (Sigma- Aldrich), tanto o Ácido artesúnicico metilado e o Acetato de diidroartemisinina diluídos foram armazenados a 4°C por até um mês em uma concentração final de 10µM.

#### 3.3 Ensaio de viabilidade celular

Para avaliar a viabilidade desses promastigotas frente aos derivados da artemisinina, foi realizado 1 ensaio para cada composto. O ensaio aplicado consiste no método de MTT, e foi realizado conforme descrito por Miguel e outros. Inóculos de 5x10<sup>6</sup> de promastigotas foram incubados em placas de 96 orifícios com os derivados em diferentes concentrações (31,25; 62,5; 125; 250; 500 µM) por 24 horas. Após esse período, o reagente brometo de 3-[4,5-dimetil- triazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio (MTT) foi adicionado a 5mg/mL e as culturas foram incubadas na estufa a 26oC por 2 horas. A seguir, as células foram lisadas com 30 µl de SDS 20% (dodecil sulfato de sódio) e a absorbância foi determinada para cada condição em microleitor de placas, utilizando comprimentos de onda de 600 nm e 650 nm como referência.

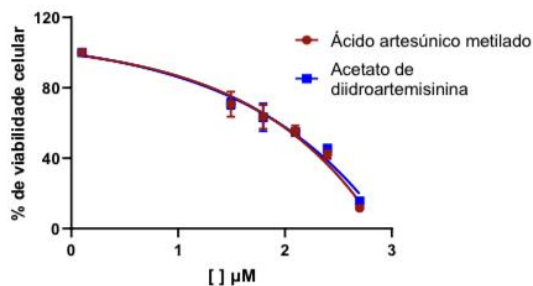
O método MTT consiste em determinar a viabilidade celular frente a um determinado composto através da leitura da absorbância do produto colorido, sendo este um resultante da clivagem do reagente pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase (Figura 1). Uma vez que essa reação é realizada somente pelas células viáveis, a densidade ótica obtida reflete a quantidade de células viáveis, podendo então expressar de forma percentual a viabilidade em relação ao grupo controle. Os resultados dos experimentos com promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* foram apresentados com desvio padrão (DP) e analisados estatisticamente pelo programa GraphPad Prism 8.0 Software (San Diego, CA, USA).

**Figura 1.** Esquema da reação de MTT. Em células viáveis é reduzido ao produto formazan, cuja absorbância é determinada no leitor de microplaca.



### 4. Resultados

Os resultados obtidos para os ensaios de viabilidade celular de promastigotas de *L. (V) braziliensis* frente aos derivados Ácido artesúnicico metilado e Acetato de diidroartemisinina pelo método de MTT estão ilustrados na Figura 2 , placa de 96 poços adicionada de MTT após a lise celular com SDS 20%.



**Figura 2.** Percentual de viabilidade celular para formas promastigotas de *Leishmania (V) braziliensis*. Valores são empregados como média e com desvio padrão ( $n = 3$  poços por grupo) de 1 ensaio realizado para avaliação a atividade de inibição de dois derivados da artemisinina, os promastigotas de *Leishmania* foram incubados em concentrações decrescentes por 24 horas, o resultado obtido pelo método do MTT. Como grupo controle foram utilizados promastigotas de *Leishmania* incubados apenas com meio de cultura.

## 5. Discussão

A Leishmaniose é um crescente problema de saúde pública no país e em outras áreas do continente americano. São bastante preocupantes as estatísticas que apontam para sua reemergência e expansão de áreas de transmissão (FIOVARANTE, 2018), evidenciando o aspecto recente de urbanização da leishmaniose que, até meados da década de 1980, acometia principalmente crianças em regiões rurais do Nordeste do Brasil (JERÔNIMO, 1994). Surtos de Leishmaniose em áreas urbanizadas como região Sudeste e Centro-Oeste do país também vêm sendo relatados (RANGEL, 2008).

É de suma importância a pesquisa de nossas drogas que forneçam uma maior segurança e eficácia no tratamento da leishmaniose já que é de nosso conhecimento a não existência de alternativas medicamentosas ideais. O tratamento atual, feito por administração parenteral e com antimoniais pentavalentes, pode provocar diversos efeitos sob o paciente como nefro e hepatotoxicidade, por exemplo. Fica claro então a importância das pesquisas com novas drogas mais eficazes contra essa parasitose e que forneça ao paciente baixos ou mínimos efeitos colaterais.

Essa pesquisa nos possibilitou avaliar a viabilidade celular de promastigotas de *Leishmania (V) braziliensis* frente à dois derivados da artemisinina. Os promastigotas tratados foram comparados ao grupo controle (promastigotas incubados apenas com meio de cultura) e então foi possível aferir se houve ou não uma atividade com redução de viabilidade de celular. A redução de viabilidade celular dos promastigotas chegou a aproximadamente 89% para o Ácido artesúnicico metilado e de 85% para o Acetato de diidroartemisinina na maior concentração testada (31,25 µM).

Alguns trabalhos apresentaram EC50% para promastigotas tratados com artemisinina e seus derivados na faixa de µM, os nossos derivados apresentaram EC50% na faixa de 125 µM. Embora esses trabalhos tenham sido com outras espécies como *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*, podemos aferir que nosso ensaio apresentou resultados parecidos com trabalhos já realizados anteriormente (MITUSO et al., 2011; CORTES et al., 2015 e SEN et al., 2006). Os dados que auxiliem a gerar fazem parte do estudo da atividade leishmanicida de derivados de artemisinina que vem sendo desenvolvido pela doutoranda Nathalia Grazzia (PPG-Biologia Animal) do IB-Unicamp.

## 6. Conclusão e considerações finais

A pesquisa com os derivados da artemisinina: Ácido artesúnicico metilado e Acetato de diidroartemisinina cedidos pelo CPQBA-Unicamp mostraram alteração significativa de viabilidade celular da forma promastigota de *Leishmania (Viannia) braziliensis* apresentando uma EC50% de aproximadamente 125  $\mu\text{M}$ , mostrando então possuírem ação leishmanicida.

Porém, está ainda sendo estudada a citotoxicidade desses compostos frente às células do sistema fagocitário do hospedeiro e, posteriormente, seus efeitos em animais infectados.

## Bibliografia

CORTES S et al. In Vitro Susceptibility of *Leishmania infantum* to Artemisinin Derivatives and Selected Trioxolanes. *Antimicrob Agents Chemother.* 59(8):5032-5.2015.

COSTA JM, et al. Cura espontânea da leishmaniose causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em lesões cutâneas. *Rev Soc Bras Med Trop.* 23:205-8. 1990.

FIOVARANTE C. Um parasita chega às metrópoles. Dificuldade de diagnóstico e clima mais quente facilitam avanço da leishmaniose visceral rumo a grandes centros urbanos. *Revista FAPESP.* V.268.2018

JERÔNIMO, S. M. B.; OLIVEIRA, R. G.; STACEY, M.; COSTA, R. M.; SWEET, J.; NASCIMENTO, E. T.; LUZ, K. G.; JERNIGAN, J.; FERNANDES, M. Z.; PEARSON, R. D. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* v. 88, p.386-8, 1994.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020. Portal Ministério da Saúde, acesso em 22 de setembro de 2020.

<https://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-tegumentar>

MUTISO JM et al. In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of a combination therapy of diminazene and artesunate against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 53(3):129-32.2011.

RANGEL, E.F.; VILELA, M.L. *Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saúde Pública.* V.24, n.12, 2008.

SEN R et al. Efficacy of artemisinin in experimental visceral leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents.* 36(1):43-9. 2006.

ZAULI-NASCIMENTO, R. C.; MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K.; PEREIRA, L. I.; PELLI DE OLIVEIRA, M. A.; RIBEIRO-DIAS, F.; DORTA, M. L.; ULIANA, S. R. In vitro sensitivity of *Leishmanis (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolate to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Trop Med Int Health,* v.15, n. 1, p. 68-76, 2010.