



## **Laboratório de Biologia Parasitária - parte 2: desde as boas práticas e descobertas científicas à interface com a química: alterações morfológicas de promastigotas de *Leishmania* sp. incubados com carbenos N-heterocíclicos de ouro (I)**

**Palavras-Chave:** [[*Leishmania* sp.]], [[morfologia]], [[ouro I]]

**Autores:**

**Ana Julia Vincoletto - E. E. Prof. Carlos Alberto Galhiego**

**Letícia Bazílio Rosa - UNICAMP**

**Profa. Dra. Camilla Abbehausen - UNICAMP**

**Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel - UNICAMP**

---

### **INTRODUÇÃO:**

As leishmanioses pertencem a um complexo grupo de doenças causadas pelos protozoários do gênero *Leishmania*, que são organismos unicelulares e apresentam duas morfologias principais: promastigota extracelular (presente no inseto vetor) e o amastigota intracelular (presente no hospedeiro mamífero) (Torres-Guerrero et al., 2017).

Sua transmissão ocorre quando o inseto vetor, que são fêmeas de flebotomíneos, regurgitam a forma promastigota em um hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo. O parasito é então fagocitado pelos macrófagos e, no interior do vacúolo parasitóforo, se diferenciam em amastigotas e se multiplicam até que ocorra a lise celular, logo, os amastigotas livres podem infectar novas células. Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor pode ingerir essas células infectadas ou parasitos livres e, no seu trato digestivo, os amastigotas se diferenciam em promastigotas reiniciando o ciclo (Torres-Guerrero et al., 2017).

As leishmanioses podem ser classificadas em leishmaniose cutânea ou visceral, de acordo com a espécie parasitária, região e resposta imune do hospedeiro. No Brasil, as principais espécies circulantes que causam a leishmaniose cutânea são *Leishmania amazonensis* e *Leishmania braziliensis*, e a única espécie que causa leishmaniose visceral é a *Leishmania infantum* (Torres-Guerrero et al., 2017).

O tratamento das leishmanioses é altamente problemático por se basearem, principalmente, em fármacos tóxicos, de difícil administração e caros. Como primeira escolha, os antimoniais pentavalentes são administrados em ambas as formas da leishmaniose por via endovenosa ou intramuscular e seus principais efeitos colaterais incluem cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, pancreatite, insuficiência renal, anemia, leucopenia, trombocitopenia, dor abdominal, náuseas,

vômitos, distúrbios sanguíneos e dor no local da injeção quando administrado via intramuscular (Alcântara et al., 2018).

Drogas de segunda escolha, como anfotericina B, pentamidina e paramomicina também são administradas por via parenteral e causam efeitos adversos graves. Portanto, a pesquisa por alternativas terapêuticas menos tóxicas, mais baratas e com menor potencial de induzir resistência parasitária é muito importante (Alcântara et al., 2018). Nesse cenário, exploramos a utilização de complexos metálicos como moléculas com potencial efeito leishmanicida e relatamos aqui os resultados encontrados. O desenvolvimento do projeto foi feito em parceria com o grupo de pesquisa da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Camilla Abbehausen, do Instituto de Química - UNICAMP, como forma de colaboração para descobrir e aprimorar os efeitos anti-*Leishmania in vitro* de complexos de ouro (I) sintetizados em seu laboratório.

## **METODOLOGIA:**

Devido à pandemia do COVID-19, todas as atividades foram adaptadas para o modo remoto e realizados à distância. Ciclos de seminários foram ministrados inicialmente para introduzir noções de rotina laboratorial aos alunos do PIBIC, com apresentações em PowerPoint sobre limpeza e esterilização, vidrarias, equipamentos e ambientes do laboratório. Também fomos ensinadas sobre diferentes tipos celulares, meios de cultura e noções de cultura celular.

Em parceria com o grupo da Prof<sup>a</sup>. Camilla Abbehausen, fomos apresentadas às etapas de sínteses dos compostos e como funciona um laboratório de química medicinal, além de nos apresentarem os principais reagentes, equipamentos e vidrarias.

A respeito das avaliações *in vitro*, ensaios de viabilidade celular foram realizados com promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* para calcular a concentração efetiva para 50% da cultura (EC50) de seis compostos carbenos N-heterocíclicos de Au(I) através do teste do MTT. Esses ensaios foram realizados pela aluna de mestrado Leticia Bazilio Rosa. A partir desse ensaio, esfregaços foram realizados para fixação dos promastigotas em lâminas para avaliar alterações morfológicas.

Os esfregaços foram obtidos a partir de 10µL da cultura de 5x10<sup>6</sup> promastigotas incubados com 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.6 e 0.8µM de cada composto após 24h. As células foram fixadas em lâminas com metanol e coradas com o kit Instant Prov para quantificação das formas morfológicas (n=150 células por concentração). Fotomicrografias foram obtidas em microscópio ótico e as imagens armazenadas em Google Drive foram encaminhadas para análise morfológica remota, a partir da qual foi realizada uma tabela com as quantificações e caracterizações morfológicas.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO:**

A partir do ensaio de viabilidade celular, foi possível calcular as EC50 de cada composto para cada espécie avaliada (Tabela 1). Para a quantificação das alterações morfológicas, foram

observadas 5 formas, sendo: fusiforme para promastigotas com morfologia normal, em divisão, espermatozoide-like (corpo arredondado), arredondado (corpo arredondado sem flagelo) e aberrante (outras formas) (Tabelas 2 e 3).

	EC50±DP (µM)	
	<i>Leishmania amazonensis</i>	<i>Leishmania braziliensis</i>
NHC1	25.99 ± 4.61	27.83 ± 4.22
NHC2	2.11 ± 1.11	8.30 ± 0.88
NHC3	1.57 ± 0.41	1.68 ± 0.36
NHC4	1.65 ± 0.16	1.70 ± 0.42
NHC5	1.96 ± 0.66	2.41 ± 1.62
NHC6	6.35 ± 3.72	8.14 ± 1.79

Dentre os compostos testados, NHC1 e NHC6 apresentaram os maiores valores de EC50, porém, para avaliação da morfologia dos promastigotas, foram selecionados somente os compostos com EC50<10µM, ou seja, o NHC1 não foi utilizado para quantificação das alterações morfológicas. A diferença da atividade dos compostos pode estar relacionada com sua estrutura molecular, no que NHC1 e NHC6 possuem a mesma estrutura principal, diferenciando somente os ligantes Cl<sup>-</sup> e DMAP, respectivamente.

**Tabela 1.** Valores de EC50 obtidos após incubação dos promastigotas com diferentes concentrações dos compostos testados por 24h (média de 3 experimentos independentes ± desvio padrão).

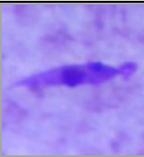
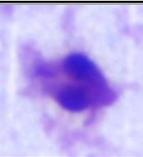
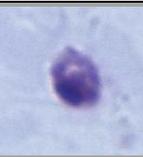
As alterações morfológicas mostradas na Tabela 2 ficaram mais frequentes a partir da concentração de 12.5 µM para os compostos NHC(2-5), que apresentaram as menores EC50 para *L. amazonensis* (Tabela 1). Na maior concentração de 25 µM, 100% das células mostraram alterações morfológicas. NHC6, entretanto, alterou somente 71% das células observadas na maior concentração e menos que 85% nas demais concentrações, refletindo sua menor atividade leishmanicida observada nos testes de viabilidade celular.

					
	Fusiforme	Em divisão	Espermatozoite-like	Arredondado	Aberrante
<b>Controle</b>	78%	22%			
<b>NHC2</b>					
<b>0.8 µM</b>	80%	19%			1%
<b>1.6 µM</b>	74%	22%		2%	2%
<b>3.125 µM</b>	85%	14%	1%		
<b>6.25 µM</b>	75%	6%		16%	3%
<b>12.5 µM</b>	4%	4%	1%	81%	
<b>25 µM</b>			85%	15%	
<b>NHC3</b>					
<b>0.8 µM</b>	85%	15%			

<b>1.6 µM</b>	81%	17%			2%
<b>3.125 µM</b>	82%	16%	2%		
<b>6.25 µM</b>	64%	5%	4%	27%	
<b>12.5 µM</b>	10%		5%	85%	
<b>25 µM</b>			24%	76%	
<b>NHC4</b>					
<b>0.8 µM</b>	82%	18%			
<b>1.6 µM</b>	90%	8%	1%		1%
<b>3.125 µM</b>	93%	7%			
<b>6.25 µM</b>	73%	4%	7%	15%	1%
<b>12.5 µM</b>	3%	2%	11%	80%	4%
<b>25 µM</b>			78%	22%	
<b>NHC5</b>					
<b>0.8 µM</b>	83%	17%			
<b>1.6 µM</b>	81%	19%			
<b>3.125 µM</b>	91%	9%			
<b>6.25 µM</b>	74%	6%	2%	18%	
<b>12.5 µM</b>	4%	3%	5%	88%	
<b>25 µM</b>			97%		3%
<b>NHC6</b>					
<b>0.8 µM</b>	90%	10%			
<b>1.6 µM</b>	89%	9%		2%	
<b>3.125 µM</b>	88%	10%		2%	
<b>6.25 µM</b>	87%	10%	2%	1%	
<b>12.5 µM</b>	90%	6%	1%	1%	2%
<b>25 µM</b>	29%			71%	

**Tabela 2.** Quantificação das alterações morfológicas observadas nos promastigotas de *L. amazonensis* após 24h de incubação com diferentes concentrações dos compostos testados NHC(2-6) (n = 150 promastigotas por condição).

A Tabela 3 mostra que a concentração de 12.5µM do NHC2 foi o suficiente para alterar 82% das células de *L. amazonensis*, mas somente 20% das células de *L. braziliensis*, refletindo a singela resistência de *L. braziliensis* no ensaio de viabilidade celular. Na concentração de 25µM, 100% e 96% das células apresentaram alterações, respectivamente. Porém, o que se observa com NHC4 é que 69% das células de *L. braziliensis* se mostraram alteradas na concentração de 6.25µM, contra 23% das células de *L. amazonensis*. Já o NHC6 se mostrou igualmente menos eficiente contra *L. braziliensis*, alterando somente 31% das células na maior concentração.

					
	Fusiforme	Em divisão	Espermatocitoide-like	Arredondado	Aberrante
<b>Controle</b>	96%	4%			
<b>NHC2</b>					
<b>0.8 µM</b>	98%	2%			
<b>1.6 µM</b>	99%				1%
<b>3.125 µM</b>	98%	2%			
<b>6.25 µM</b>	94%	6%			
<b>12.5 µM</b>	75%	5%	17%	3%	

<b>25 µM</b>	4%		89%		7%
<b>NHC3</b>					
<b>0.8 µM</b>	97%	3%			
<b>1.6 µM</b>	98%	2%			
<b>3.125 µM</b>	96%	4%			
<b>6.25 µM</b>	92%	2%	3%	1%	2%
<b>12.5 µM</b>	3%		94%		3%
<b>25 µM</b>			100%		
<b>NHC4</b>					
<b>0.8 µM</b>	95%	5%			
<b>1.6 µM</b>	86%	8%	6%		
<b>3.125 µM</b>	88%	2%	10%		
<b>6.25 µM</b>	31%		62%		7%
<b>12.5 µM</b>	8%		90%		2%
<b>25 µM</b>	3%		94%		3%
<b>NHC5</b>					
<b>0.8 µM</b>	98%	2%			
<b>1.6 µM</b>	97%	2%	1%		
<b>3.125 µM</b>	93%	3%	4%		
<b>6.25 µM</b>	87%		13%		
<b>12.5 µM</b>	16%	2%	76%		6%
<b>25 µM</b>			100%		
<b>NHC6</b>					
<b>0.8 µM</b>	97%	3%			
<b>1.6 µM</b>	97%	3%			
<b>3.125 µM</b>	91%	3%	3%	1%	2%
<b>6.25 µM</b>	96%	4%			
<b>12.5 µM</b>	95%	2%	2%		1%
<b>25 µM</b>	67%	2%	30%		1%

**Tabela 3.** Quantificação das alterações morfológicas observadas nos promastigotas de *L. braziliensis* após 24h de incubação com diferentes concentrações dos compostos testados NHC(2-6) (n = 150 promastigotas por condição).

Essas alterações morfológicas podem estar relacionadas ao tipo de morte celular induzida pela incubação com os compostos testados. Estímulos que induzem a morte celular por apoptose em *Leishmania* incluem arredondamento celular, encolhimento celular, aumento da permeabilidade de membrana sem interferência na integridade, modificações mitocondriais, condensação da cromatina, fragmentação nuclear e fragmentação de DNA. A identificação de compostos que induzem a morte celular por apoptose em *Leishmania* é muito importante, pois proporcionaria a eliminação do parasito sem induzir inflamação ou prejudicar o hospedeiro (Basmacıyan & Casanova, 2019).

## BIBLIOGRAFIA

- TORRES-GUERRERO, Edoardo. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Res**. 2017; 6: 750.
- ALCÂNTARA, Laura. *et al.* Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. **Int J Parasitol Drugs Drug Resist**. 2018; 8(3): 430-439.
- BASMACIYAN, Louise; CASANOVA, Magali. Cell death in Leishmania. **Parasite**. 2019; 26: 71.