



# **LABORATÓRIO DE BIOLOGIA PARASITÁRIA – PARTE 2: DESDE AS BOAS PRÁTICAS E DESCOBERTAS CIENTÍFICAS – A INTERFACE COM A QUÍMICA – Ação de compostos contra espécies de *Leishmania sp.***

**Palavras-Chave:** leishmaniose, macrófagos, citotóxico

**Autores/as:**

**Kelly Christine Silva Cardoso De Lacerda [UNICAMP]**

**Msc. Mariana Borges Costa Brioschi [UNICAMP]**

**Msc. Nathália Grazzia [UNICAMP]**

**Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel [UNICAMP]**

---

## **INTRODUÇÃO:**

Conhecido como PIBIC-EM, o Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica para o Ensino Médio tem como finalidade integrar estudantes do ensino médio de escolas públicas em atividades de pesquisa científica, sob a orientação de professores e pesquisadores da UNICAMP e com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (BATISTA, 2016). Um dos laboratórios participantes deste projeto é o Laboratório de Estudos de Biologia da Infecção por *Leishmania* (LEBIL) onde são realizados estudos sobre o protozoário *Leishmania* e busca entender como a doença se manifesta em seu hospedeiro e as novas formas de tratá-la.

Em virtude da pandemia causada pelo vírus SARS-Cov2, desenvolvemos todos os nossos aprendizados do PIBIC-EM de maneira virtual, utilizando principalmente a plataforma do Google Meet. Durante o primeiro semestre, aprendemos as normas e regras de um ambiente laboratorial e sobre o parasito *Leishmania sp.*, causador da leishmaniose, que é o foco dos estudos no laboratório.

Os parasitos são transmitidos ao homem a partir da picada de um inseto vetor, os flebotomíneos conhecidos popularmente por “mosquito-palha”. A doença apresenta vários tipos, sendo principais manifestações clínicas: leishmaniose visceral e cutânea. Seus principais hospedeiros são animais silvestres, como por exemplo canídeos, marsupiais e roedores, porém, com a aproximação dos humanos e seus animais à natureza, estes começam a apresentar também a doença. Não existe hoje uma vacina para humanos que o protejam da doença, essa

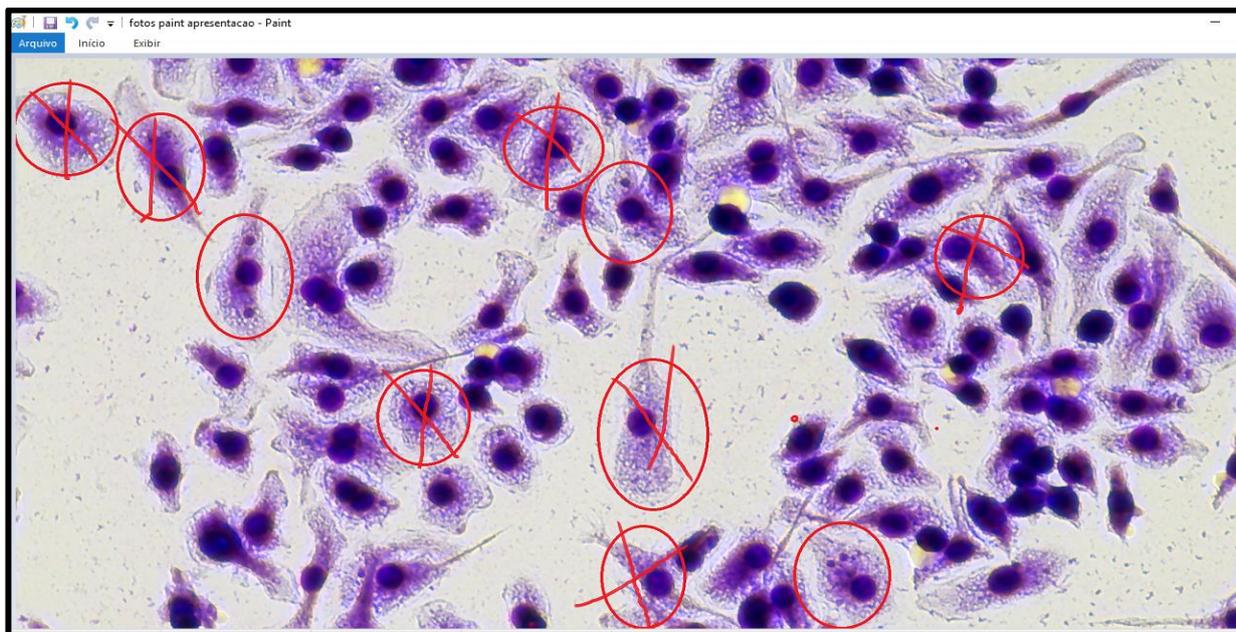
vacina é apenas apresentada para animais. Existem, contudo, tratamentos medicamentosos para os pacientes humanos, porém seus efeitos colaterais são diversos (MDS, 2020).

O projeto realizado no segundo semestre teve como objetivo analisar a eficiência de dois compostos diferentes denominados aqui como C1 e C2, incubados com macrófagos infectados com *L. braziliensis* ou *L. infantum* durante 24 e 48 horas.

## **METODOLOGIA:**

Para a realização do projeto, todos os experimentos foram realizados por estudantes de pós-graduação do laboratório. Foram então obtidos macrófagos a partir da diferenciação de células da medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos Balb/C e, além disso, culturas de promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum* foram mantidas para a realização do projeto. Com estas células, inicialmente foram realizados testes de toxicidade de diferentes compostos.

Os compostos C1 e C2 foram mais tóxicos para os parasitas em relação aos macrófagos, dessa forma foram realizadas infecções *in vitro* com as espécies de *Leishmania*. Os compostos foram administrados com 4 concentrações: 0,5, 1,0, 5 e 25 microM; por 24 e 48 horas. Para cada concentração e cada tempo, o experimento foi realizado em triplicata sobre lamínulas. As lamínulas foram então coradas e fotografadas para compartilhamento das imagens para análise remota. A partir do banco de imagens enviado, realizou-se a contagem da quantidade de parasitas e células que estavam infectadas ou não (**Figura 1**). Para isso, foi preciso aprender a identificar formas intracelulares dos parasitos e células que estavam infectadas versus células não infectadas.



**Figura 1:** Exemplo de imagem obtida para contagem de macrófagos infectados e não infectados a partir de imagens tiradas em microscópio óptico. Os círculos vermelhos indicam células contabilizadas como positivas quanto à infecção intracelular. Os círculos cruzados (X) indicam células não infectadas. Fotomicrografia obtida em microscópio óptico com aumento final de 400x.

Ao final da contagem, analisamos a taxa de infecção, o número de parasitas a cada 100 macrófagos infectados e o índice de infectividade (taxa de infecção multiplicada pelo número de parasitas para 100 macrófagos) (**Figura 2**).

	A	B	C	D	E	F	G	H
1	24 HORAS	Macrófagos totais	Leishmania	Macrófagos não infectados	Macrófagos infectados	Taxa de infecção	Nº de parasitos a cada 100 macrófagos infectados	Índice de infectividade
2	Controle	334	58	283	51	15,26946108	113,7254902	1736,526946
3	Controle	311	100	245	66	21,22186495	151,5151515	3215,434084
4	Controle	322	93	256	66	20,49689441	140,9090909	2888,198758
5	C2 (0,5uM)	302	57	254	48	15,89403974	118,75	1887,417219
6	C2 (0,5uM)	322	42	286	36	11,18012422	116,6666667	1304,347826
7	C2 (0,5uM)	301	64	246	55	18,27242525	116,3636364	2126,245847

**Figura 2:** Exemplo de valores da contagem e cálculo da taxa de infecção, número de parasitos a cada 100 macrófagos infectados e índice de infectividade. Neste caso, as quantificações foram planilhadas no programa Excel (Windows Microsoft Office).

## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Para os dois compostos, foram observadas diminuição da taxa de infecção para o tratamento de 48 horas, porém não foi uma diminuição significativa estatisticamente em relação ao controle. Infelizmente, o número de parasitos a cada 100 macrófagos infectados não alterou

em nenhuma das condições. A maior concentração (25 microM) apresentou-se tóxica para os macrófagos, dessa forma, não foi possível realizar a contagem com amostragem significativa.

Estes compostos pertencem a uma série de moléculas sintéticas que estão sendo avaliadas no Laboratório. Dentre os candidatos de uma série, é importante avaliar as melhores moléculas em termos de atividade. No caso, conhecer os compostos com atividade fraca é muito importante porque permite aos químicos medicinais alterar as estruturas das moléculas, possibilitando melhorar ou otimizar a atividade contra o parasito. Estes aspectos de química medicinal foram também apresentados aos alunos do PIBIC-EM durante o estágio, em parceria com o grupo da Profa. Dra. Camilla Abbehausen do IQ-UNICAMP. Novos candidatos desta série serão explorados quanto à atividade contra amastigotas intracelulares, as formas relevantes do ponto de vista clínico na leishmaniose.

## **CONCLUSÕES:**

O presente trabalho foi importante para o conhecimento de metodologias utilizadas em laboratório assim como as regras e normas a serem seguidas ao se desenvolver pesquisa experimental básica. Os dados obtidos não foram significativos, porém foi um grande aprendizado ao longo do projeto e abriu novas perspectivas para trabalhos futuros.

## **BIBLIOGRAFIA**

BATISTA, C. E. **O que é o PIBIC-EM?** Disponível em: <<https://slideplayer.com.br/slide/10658523/>> Acesso em 14 de agosto de 2021.

**Manual MSD, Versão para profissionais da saúde**, 2020. Disponível em: <[https://www.msmanuals.com/pt/profissional/multimedia/image/v1015907\\_pt.](https://www.msmanuals.com/pt/profissional/multimedia/image/v1015907_pt.)> Acesso em 18 de fevereiro de 2021.