



ATIVIDADES EM UM LABORATÓRIO DE PESQUISA - ROTINA DA PARASITOLOGIA BÁSICA À PESQUISA DE NOVOS MEDICAMENTOS CONTRA *Leishmania*

Palavras-Chave: Complexos metálicos, *Leishmania*, Promastigotas

Autores/as: Allanys da Silva Estevão Pereira; Andressa Cristina Bernardo da Silva; Lorena Ferrari dos Santos
Monitores: Virlânio Alves de Oliveira Filho; Marcus Sávio Araujo Garcia
Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel; IB, UNICAMP

1. Introdução

1.1. *Leishmania* e Leishmanioses

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios de células que participam da imunidade do hospedeiro, principalmente macrófagos. Caracterizam-se por apresentar duas morfologias distintas: a forma promastigota possui o corpo alongado, flagelo livre, medindo em torno de 14 a 20 μm , e amastigota apresenta formato arredondado/oval, tem o flagelo internalizado e mede em torno de 2,5 a 5,0 μm (Brasil, 2017).

Em relação ao seu ciclo de vida, o principal vetor de *Leishmania* é o flebotomíneo, também chamado de mosquito palha, onde somente as fêmeas se alimentam de sangue. O ciclo se dá quando o vetor ingere sangue de algum animal infectado contendo a forma amastigota que é liberada no intestino do vetor e logo se diferencia para forma promastigota, capaz de se dividir no intestino do inseto e migrar para a faringe do mesmo. Posteriormente, o vetor se alimenta de um novo hospedeiro e o infecta. No hospedeiro (mamíferos silvestres, domésticos e o ser humano), promastigotas se transformam em amastigotas no interior de macrófagos, essas se multiplicam e começam a invadir outras células e, com isso, o ciclo se repete. Uma vez infectado, o hospedeiro vertebrado torna-se reservatório do agente (Anversa *et al.*, 2018).

Atualmente, mais de 20 espécies de *Leishmania* são responsáveis pela infecção e as diferentes manifestações clínicas são denominadas: Leishmaniose Tegumentar (LT), causa úlceras na pele geralmente no local da picada, e quando atinge as mucosas nasal e bucal é conhecida como Leishmaniose Mucocutânea e levando a lesões nodulares pelo corpo, a Leishmaniose Difusa. A Leishmaniose Visceral é a forma mais perigosa, pois além de ocorrer febre, também afeta os órgãos como baço e fígado, causando um aumento extremamente significativo dos mesmos e pode ser fatal (Brasil, 2017; WHO, 2023).

No Brasil, são registrados cerca de 21.000 casos/ano de LT, com coeficiente de incidência de 8,6 casos/100.000 habitantes nos últimos 5 anos. A região Norte apresenta o maior coeficiente (46,4 casos/100.000 habitantes), seguida das regiões Centro-Oeste (17,2 casos/10.000 habitantes) e Nordeste (8 casos/100.000 habitantes).



habitantes), sendo *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *L. (Viannia) braziliensis* as principais espécies responsáveis pelos casos de LT nessas regiões (Brasil, 2022).

1.2. Tratamento

A Leishmaniose é uma doença tropical negligenciada, ou seja, não recebe a atenção que supostamente deveria receber, sendo assim os medicamentos que já existem para o tratamento da enfermidade são os mesmos há décadas, apresentam elevada toxicidade e exigem longos períodos de tratamento, levando o paciente a não adesão ou desistência do tratamento, pois acometem principalmente moradores de zonas rurais e/ou de baixo poder aquisitivo (Brasil, 2017).

No Brasil, existem três opções medicamentosas para o tratamento das leishmanioses. O Antimonial Pentavalente é o fármaco de primeira escolha, apresenta eficácia variável e dentre seus efeitos colaterais estão presentes a hepato e nefrotoxicidade, arritmia cardíaca e pancreatite. Fármaco de segunda escolha, a Anfotericina B leva à nefrotoxicidade como efeito colateral mais importante. O uso da Pentamidina no tratamento das Leishmanioses limita-se devido à alta toxicidade, principalmente para o coração, rins e sistema gastrointestinal (Alcântara *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2021).

Embora exista uma quantidade considerável de fármacos e estratégias medicamentosas para o tratamento das Leishmanioses, ao longo dos anos as alternativas de tratamento utilizadas tornaram-se cada vez mais limitadas e a busca por novos agentes leishmanicidas de baixo custo e com efeitos colaterais reduzidos é constante e necessária (Passero *et al.*, 2018). Nesse sentido, os compostos metálicos demonstram ser alternativas promissoras como potenciais agentes antileishmania (Rosa *et al.*, 2021).

1.3. Complexos metálicos na medicina

Os metais têm sido utilizados na medicina há séculos e até hoje são frequentemente usados como agentes anti-inflamatórios, antivirais, antibacterianos e anticancerígenos e para muitas outras indicações (Kabir *et al.*, 2023). A exemplo disso, complexos de Platina (Pt) são amplamente aplicados no tratamento dos mais diversos tipos de câncer, ao passo que complexos de Paládio (Pd) e Titânio (Ti) continuam em testes clínicos e apresentam potencial atividade contra células tumorais (Wang *et al.*, 2019). Já os complexos de Prata (Ag) e Cobre (Cu) atuam como agentes antibacterianos, enquanto o uso do Ouro (Au) remonta à antiguidade, e têm sido utilizados na prática clínica, como a auranofina, um agente antirreumático que também demonstrou eficácia *in vitro* contra SARS-CoV-2 (Wang *et al.*, 2019; Gil-Moles *et al.*, 2020).

O uso dos metais estende-se aos ensaios antiparasitários, onde complexos de Ag e Cu demonstraram efeito leishmanicida contra formas promastigotas e amastigotas do parasito em ensaios *in vitro* (Espuri *et al.*, 2019; Chagas *et al.*, 2021). No Laboratório de Estudos de Biologia da Infecção por *Leishmania* (LEBIL), foi demonstrada a eficácia de complexos de Au contra *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Minori *et al.*, 2022; Rosa *et al.*, 2022). Com



isso, além de acompanhar as atividades do laboratório, o objetivo do projeto foi avaliar a eficácia de um novo complexo de Au contra a espécie *L. amazonensis*, com foco nas alterações morfológicas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Cultivo do parasito

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas a 25°C em meio 199 (Gibco-BRL, Invitrogen), suplementado com penicilina 50 unidades/mL, estreptomicina 50 µg/mL, HEPES 40 mM, adenina 0,1 M, biotina 0.0001%, hemina 0.0005% e 10% de soro fetal bovino - SFB (Invitrogen®).

2.2. Incubação com complexo de Au

Culturas de formas promastigotas em fase logarítmica (fase de crescimento exponencial), foram incubadas em placas de cultura de 96 poços (5×10⁶ parasitos/poço) com concentrações decrescentes do composto de Au (24; 12; 6; 3; 1,5; 0,75 e 0,37 µM), e mantidas em estufa a 25°C durante 24 horas. Todo o ensaio foi realizado em triplicata biológica.

2.3. Esfregaços espessos para avaliação da morfologia do parasita

Após o período de incubação, alíquotas de 10 µL foram retiradas de cada poço e foram colocadas em lâminas de vidro para preparação de esfregaços espessos. Em seguida, os esfregaços foram secos em temperatura ambiente por 24 horas, fixados em metanol puro por 1 minuto e corados com kit InstantProv (NewProv, Brasil). Pelo menos 150 promastigotas foram examinados por poço para cada concentração do complexo testado por microscopia óptica (100× imersão em óleo, Nikon Eclipse E200, Nikon Corp.). A morfologia do parasita foi classificada como: 'fusiforme', 'replicante', 'sem flagelo', 'redondo', 'aberrante' e tipo espermatozoide (sptz) e a frequência de cada forma (%) foi calculada para cada concentração do complexo e para o grupo controle (não tratado).

3. Resultados e Discussão

No grupo controle (0 µM), ~80% das formas promastigotas identificadas foram classificadas morfológicamente como fusiforme e ~20% como replicantes, consideradas formas típicas do parasito, resultado esperado pois o grupo em questão não foi tratado. A maior concentração (24 µM) do complexo de Au causou morte de 100% das células tratadas, resultado positivo e de grande relevância, mas que impossibilitou a análise morfológica, dada a presença de restos de células depositados no fundo dos poços de cultivo.

A 12 µM, células incubadas com o composto apresentaram-se aberrantes (~15%), ao passo que células com morfologia arredondada foram observadas principalmente nas concentrações de 6 e 1,5 µM. Outras anomalias morfológicas como promastigotas sem flagelo e tipo espermatozoide também foram observadas em algumas



concentrações. As morfologias características das formas promastigotas de *Leishmania* (replicante e fusiforme), bem como as anomalias morfológicas e as porcentagens de cada uma estão representadas na Figura 1.

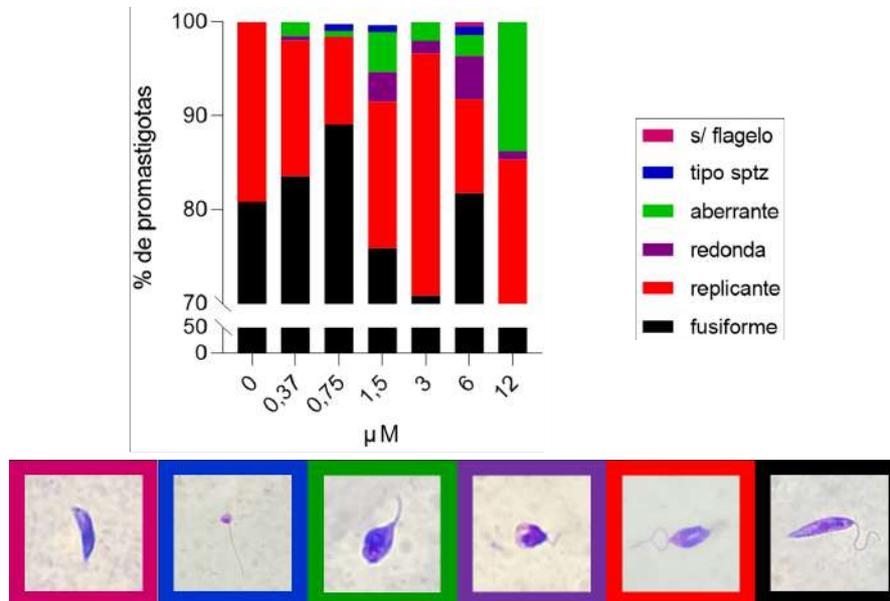


Figura 1. Quantificação dos aspectos morfológicos de promastigotas de *L. amazonensis* (em porcentagens) observados após 24 h de incubação com 24; 12; 6; 3; 1,5; 0,75 e 0,37 μM de um complexo de Au. Fotomicrografias de parasitas corados são mostradas para exemplificar 6 morfotipos detectados: sem flagelo, semelhante ao esperma, aberrante, redonda, replicante e fusiforme. A cor de cada imagem corresponde à frequência das barras coloridas no gráfico. Pelo menos 150 promastigotas foram contados para cada condição. "0" no eixo x corresponde a promastigotas de controle não tratadas.

Alterações morfológicas foram previamente observadas em culturas de promastigotas incubadas com outros complexos metálicos, a exemplo do Cobalto (Co), onde formas aberrantes, arredondadas e sem flagelo foram observadas (Lorete-Terra *et al.*, 2021). Rosa e cols. também demonstraram que complexos de Au(I) foram capazes de alterar em 100% a morfologia das formas promastigotas de *L. amazonensis* quando tratadas com a maior concentração (25 μM) do complexo, e dados semelhantes foram observados nas culturas de *L. braziliensis*, onde as formas aberrante, tipo espermatozoide e redonda foram as principais anomalias encontradas (Rosa *et al.*, 2022). As alterações na morfologia típica do parasito podem interferir na sua capacidade de replicação e infectividade, e são um indicativo do potencial leishmanicida do complexo de Au testado no presente estudo.

4. Conclusões

Durante os seis meses de estágio no LEBIL, foram realizadas diversas atividades em prol do conhecimento sobre a rotina do laboratório e parasitologia básica, focando no protozoário do gênero *Leishmania*. Colocamos em prática o aprendizado obtido ao longo do período, gerando os resultados apresentados neste projeto. É evidente a necessidade de novos medicamentos para o tratamento das Leishmanioses, e os complexos metálicos podem ser a alternativa ideal, pois podem ser manipulados de diversas formas, apresentar pouco efeitos adversos e baixo custo.



5. Referências

ALCÂNTARA, M. *et al.* Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. **IJP: Drugs and Drug Resistance**. 430–439. 2018.

ANVERSA, L. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: a general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, p. 281-289, 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEP. DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS TRANSMISSÍVEIS. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar/Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. Brasília/DF, 2017.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA. Distribuição da Leishmaniose Tegumentar. Brasília/DF, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/l/lt/situacao-epidemiologica>. Acessado em Julho de 2023.

CHAGAS, AFS. *et al.* In vitro evaluation of antileishmanial activity of copper (I) complexes. **Acta Brasiliensis**, v. 5, n. 1, p. 1-6, 2021

ESPURI, PF. *et al.* Synthesis and evaluation of the antileishmanial activity of silver compounds containing imidazolidine-2-thione. **JBIC Journal of Biol. Inorganic Chem.**, v. 24, n. 3, p. 419-432, 2019.

GIL MOLES, M. *et al.* Gold Metallodrugs to Target Coronavirus Proteins: Inhibitory Effects on the Spike ACE2 Interaction and on PLpro Protease Activity by Auranofin and Gold Organometallics. **Chemistry (Weinheim an Der Bergstrasse, Germany)**, v. 26, n. 66, p. 15140, 2020.

LORETE-TERRA, ALM. *et al.* In vitro activity on *Leishmania amazonensis* promastigote forms of a new CO (II) coordination complex. **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 2, p. 14653-14668, 2021.

KABIR, E.; NOYON, MK; HOSSAIN, MA. Synthesis, biological and medicinal impacts of metallodrugs: A study. **Results in Chemistry**, p. 100935, 2023.

MINORI, K. *et al.* Comparing the Antileishmanial Activity of Gold (I) and Gold (III) Compounds in *L.*

amazonensis and *L. braziliensis* in Vitro. **ChemMedChem**, v. 15, n. 22, p. 2146-2150, 2020.

OLIVEIRA, SS. *et al.* Overcoming multi resistant leishmania treatment by nanoencapsulation of potent antimicrobials. **Journal of Chem; Tech. & Biotech.**, v. 96, n. 8, p. 2123-2140, 2021.

PASSERO, LF. *et al.* Conventional versus natural alternative treatments for leishmaniasis: a review. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 15, p. 1275-1286, 2018.

ROSA, LB. *et al.* A “Golden Age” for the discovery of new antileishmanial agents: Current status of leishmanicidal gold complexes and prospective targets beyond the trypanothione system. **ChemMedChem**, v. 16, n. 11, p. 1682-1696, 2021.

ROSA, LB. *et al.* Antileishmanial activity and insights into the mechanisms of action of symmetric Au (I) benzyl and aryl-N-heterocyclic carbenes. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 229, p. 111726, 2022.

WANG, X. *et al.* Stimuli-responsive therapeutic metallodrugs. **Chemical reviews**, v. 119, n. 2, p. 1138-1192, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. World Health Organization (2023). Leishmaniasis. Key Facts. Updated January 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/leishmaniasis>. Acessado em Julho de 2023.