



## 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  $\mu\text{m}$ , e amastigota apresenta formato arredondado/oval, tem o flagelo internalizado e mede em torno de 2,5 a 5,0  $\mu\text{m}$  (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 (5×10<sup>6</sup> 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).

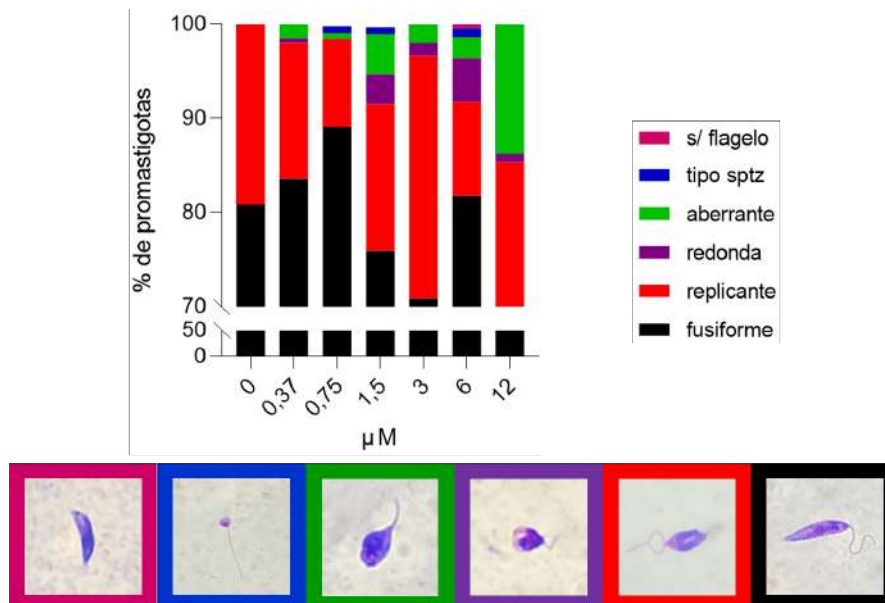
## 3. Resultados e Discussão

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.