

2.10.99 - Farmacologia.

AValiação DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE TRITERPENo ISOLADO DE *Albizia inundata*

Jessica da S. Teixeira^{1,2*}, Dahara Keyse C. Silva^{1,2}, Eberson M. J. Andrade³, Aníbal de F. S. Júnior⁴, Elisalva T. Guimarães⁵

1. Estudante de IC do DCV-UNEB

2. Estudante de IC do IGM-FIOCRUZ-BA

3. Mestre em Química Aplicada pela UNEB

4. Professor do DCV-UNEB

5. Professora e Pesquisadora do DCV-UNEB e IGM-FIOCRUZ-BA/Orientadora

Resumo

As leishmanioses representam um sério problema de saúde pública em vários países subtropicais e tropicais, incluindo o Brasil. O tratamento atual apresenta diversas limitações devido à elevada toxicidade, efeitos adversos e alto custo. Nesse contexto, a investigação de novas drogas torna-se relevante. O objetivo deste trabalho foi investigar o potencial leishmanicida da lupenona, um triterpeno isolado de *Albizia inundata* em modelos experimentais *in vitro*. O triterpeno apresentou CC₅₀ igual a 37,5 ± 9,0 µM. O composto inibiu discretamente a proliferação de promastigotas. No ensaio de infecção de macrófagos *in vitro*, o composto não foi capaz de reduzir a infecção, mas reduziu pela metade o número de amastigotas, na concentração de 20 µM. Inclusões lipídicas foram observadas no citoplasma de amastigotas tratados com a lupenona, sugerindo uma possível associação a estresse oxidativo e dano mitocondrial. Os resultados indicam que a lupenona possui uma discreta atividade antileishmania.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*; tratamento; leishmaniose tegumentar.

Apoio financeiro: CNPq, UNEB, IGM-Fiocruz.

Trabalho selecionado para a JNIC: UNEB.

Introdução

As leishmanioses representam um sério problema de saúde pública em vários países subtropicais e tropicais, incluindo o Brasil. Por sua forte ligação com os determinantes sociais, é considerada uma doença negligenciada, chegando a 12 milhões indivíduos infectados no mundo e uma taxa de 0,2 a 0,3 milhões de mortes por ano (OMS, 2012). Podem se manifestar sob diferentes formas clínicas a depender da espécie do parasito envolvida na infecção e do perfil da resposta imunológica do hospedeiro. Dessa forma, as leishmanioses podem se dividir em duas formas clínicas principais: a leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral (KAYE E SCOTT, 2011; ROCHA, 2012). A leishmaniose tegumentar é a forma clínica com o maior número de casos em todo o mundo, com uma incidência de aproximadamente 1,5 milhões de novos casos por ano. Nos países da América do Sul, a espécie *Leishmania amazonensis* é um dos principais agentes etiológicos capaz de produzir um amplo espectro de manifestações, incluindo a forma cutânea localizada, mucocutânea e cutânea difusa (WHO, 2000; STROPPA, 2017). O tratamento de primeira linha consiste na utilização dos antimoniais pentavalentes, e outros quimioterápicos como a anfotericina B. Entretanto, estes medicamentos apresentam diversas limitações devido à elevada toxicidade, efeitos adversos severos, além da necessidade de administração pela via parenteral associada à baixa adesão dos pacientes e o alto custo (BRASIL, 2010; TIUMAN et al., 2011). Neste contexto, a investigação de novas drogas torna-se relevante. Diversas espécies do gênero *Albizia* apresentam descrições na literatura de atividades biológicas (SUJATHA et al., 2013) como: antioxidante (KHATOON et al., 2013), antidiabética (KANG et al., 2000), antibacteriana (YADAVA et al., 2000), antitumoral e anti-inflamatória (ZHENG, et al., 2006). Há apenas uma única publicação na literatura sobre a espécie *Albizia inundata* (ZHANG et al., 2011), o que torna a investigação acerca desta espécie, inédita e relevante. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o potencial leishmanicida de triterpeno isolado de *A. inundata* em modelos experimentais *in vitro*.

Metodologia

O triterpeno foi isolado por cromatografia em camada delgada, a partir do extrato éter de petróleo da folha de *A. inundata*, e a identificação foi realizada por ressonância magnética nuclear. A citotoxicidade do triterpeno e dos extratos da *A. inundata* foi determinada em macrófagos imortalizados da linhagem J774 a partir do método do AlamarBlue (MEIRA et al., 2017). O efeito do composto sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* foi avaliado em cultura axênica. Durante cinco dias, os parasitos foram observados ao microscópio óptico e o número de parasitos viáveis foi determinado através da contagem em câmara de Neubauer (GUIMARÃES et al., 2006). O efeito do composto sobre as formas amastigotas foi avaliado através da infecção de macrófagos da linhagem J774 por *L. amazonensis*. A porcentagem de macrófagos infectados e o número de

amastigotas por macrófagos foram determinados pela contagem de 100 células em campos aleatórios em microscópio óptico (GUIMARÃES et al., 2009). As alterações ultra estruturais em macrófagos infectados por *L. amazonensis* foram investigadas por microscopia eletrônica de transmissão (ROCHA et al, 2013).

Resultados e Discussão

O extrato éter de petróleo da folha de *A. inundata* apresentou valor de concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) superior a 100 µg mL⁻¹. Diante da baixa citotoxicidade, o triterpeno foi isolado a partir deste extrato e a sua atividade antileishmania foi investigada. O triterpeno lupenona apresentou baixa citotoxicidade quando comparado com a anfotericina, a droga de referência para tratamento das leishmanioses, com valor de CC₅₀ igual a 37,5 ± 9,0 µM. A lupenona foi capaz de inibir discretamente a proliferação de promastigotas na cultura, nas concentrações de 5, 10 e 20 µM. Na infecção de macrófagos *in vitro*, verificou-se que após tratamento nas concentrações de 5, 10 e 20 µM não houve redução significativa no percentual de macrófagos infectados. Em relação ao número de amastigotas, a lupenona foi capaz de reduzir pela metade o número de amastigotas por macrófagos, na concentração de 20 µM. Possíveis alterações ultraestruturais em amastigotas intracelulares foram investigadas através de microscopia eletrônica de transmissão. Observou-se que os parasitos não tratados apresentaram morfologia normal, sem alterações. A presença de inclusões lipídicas foi observada no citoplasma de amastigotas tratados com a lupenona, sugerindo uma possível associação a estresse oxidativo e dano mitocondrial.

Conclusões

Os resultados indicam que a lupenona possui uma discreta atividade antileishmania e apontam a necessidade da investigação de novos isolados de *A. inundata* para o tratamento das leishmanioses.

Referências bibliográficas

- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª edição. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.
- GUIMARAES, E.T.; LIMA, M.S.; SANTOS, L.A.; RIBEIRO, I.M.; TOMASSINI, T.B.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; TEIXEIRA, M.M.; DOS SANTOS, W.L.C.; Soares, M.B.P. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in *in vitro* and *in vivo* models of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 1, p. 84- 87, 2009.
- GUIMARÃES, E.T.; SANTOS, L.A.; DOS SANTOS, R.R.; TEIXEIRA, M.M.; DOS SANTOS, W.L.; SOARES, M.B. Role of interleukin-4 and prostaglandin E₂ in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. **Microbes and infection**, v. 8, n. 5, p. 1219-1226, 2006.
- KANG T.H., JEONG S.J., KIM N.Y., HIGUCHI R., KIM Y.C. Sedative activity of two flavonol glycosides isolated from the flowers of *Albizia julibrissin*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, p. 321–323, 2000.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature Review Microbiology**, v. 9, 2011.
- KHATOON M., ISLAM E., ISLAM R., RAHMAN A.A., ALAM A.H., KHONDKAR P., RASHID M., PARVIN S. Estimation of total phenol and *in vitro* antioxidant activity of *Albizia procera* leaves. **BMC Research Notes**, v. 6, p. 121, 2013.
- MEIRA, C.S.; DO ESPÍRITO SANTO, R.F., DOS SANTOS, T.B.; ORGE, I.D.; SILVA, D.K.C., GUIMARÃES, E.T.; FRANÇA, L.S.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MOREIRA, D.R.M.; Soares, M.B.P. Betulinic acid derivative BA5, a dual NF-kB/calcineurin inhibitor, alleviates experimental shock and delayed hypersensitivity. **European journal of pharmacology**, v. 815, p. 156-165, 2017.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis: worldwide epidemiological and drug access update**. Geneva, 2012.
- ROCHA, V. P. C., NONATO, F. R., GUIMARÃES, E. T., FREITAS, L. A. R. & SOARES, M. B. P. Activity of antimalarial drugs *in vitro* and in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, 1001–1010, 2013.
- ROCHA, Vinícius Pinto Costa et al. **Avaliação de atividade antileishmania de fármacos antimaláricos *in vitro* e em modelo murino de leishmaniose tegumentar**. 2012. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.
- STROPPIA, P.H.F. et al. Effect of 1,2,3-triazole salts, non-classical bioisosteres of miltefosine, on *Leishmania amazonensis*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 25, p. 3034-3045, 2017.
- SUJATHA, V. et al. Phytopharmacological properties of *Albizia* species: a review. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, p. 70-73, 2013.
- TIUMAN, T.S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 525–532, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO Report on Global Surveillance of Epidemic-prone Infectious Diseases**. Ch 10.

Leishmaniasis and leishmania/hiv co-infection, 2000.

YADAVA R.N., TRIPATHI P. Chemical examination and antiinflammatory action of the extract from the stem of *Albizia procera*. **Research Journal of Chemistry and Environment**, v. 4, p. 57-60, 2000.

ZHANG, H., SAMADI, A.K., RAO, K.V., COHEN, M.S., TIMMERMANN, B.N. Cytotoxic oleanane-type saponins from *Albizia inundata*. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 477-482, 2011.

ZHENG L., ZHENG J., ZHAO Y., WANG B., LIJUN W., LIANG, H. Three antitumor saponins from *Albizia julibrissin*. **Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters**, v. 16, p. 2765–2768, 2006.