

ESTUDO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE *Schinus terebinthifolius*, *Phyllanthus niruri*, *Mentha peperita*, *Matricaria racutita*, *Maytenus ilicifolia* e *Syzygium jambolanum*

Alisson Alcantara Alves^{1*}, Aline Cavalcanti de Queiroz²

1. Estudante do curso de Farmácia, da Universidade Federal de Alagoas (UFAL)
2. Professora da UFAL/Campus Arapiraca - Departamento de Medicina/Orientadora

Resumo

As Leishmanioses são doenças parasitárias, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Onde à cada ano, quase dois milhões de novos casos dessa zoonose são registrados no mundo. O trabalho consiste em avaliar os efeitos farmacológicos das seguintes plantas medicinais; *Schinus terebinthifolius*, *Phyllanthus niruri*, *Mentha peperita*, *Matricaria racutita*, *Maytenus ilicifolia* e *Syzygium jambolanum*, que são relatadas na lista de plantas medicinais do SUS. Onde foi observado, que nenhuma das seis espécies vegetais apresentou efeito citotóxico, frente a macrófago. Além disso, foi analisada a atividade e a CI50 dos compostos frente amastigotas de *Leishmania spp.* onde foi constatado que nenhuma das amostra tiveram efeito na sua concentração máxima testada. Posteriormente, foi feito de dosagem de óxido nítrico, onde quatro das seis plantas testadas, induziram níveis de nitrito maiores que 20,0 µM. Constatando que essas plantas possuem efeito positivo no aumento de óxido nítrico.

Palavras-chave: Leishmaniose, Fármacos leishmanicidas, Plantas medicinais.

Apoio financeiro: MS/FAPEAL/SESAU-AL

Trabalho selecionado para a JNIC: UFAL

Introdução

As leishmanioses são antropozoonoses consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante aspecto clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano (BRASIL,2017).

Nas Américas, a leishmaniose cutânea e mucosa ocorre em 20 países, sendo endêmica em 18 deles, com aproximadamente 46.082 casos de leishmaniose cutânea e mucosa, desse total, 70% foram reportados no Brasil (19.395), onde na maioria dos casos ocorreram nas regiões Norte-Nordeste (OPAS/OMS, 2017).

O tratamento atual disponível para a leishmaniose é restrito a poucas drogas de primeira escolha: antimoniais pentavalentes, e os fármacos de segunda escolha: miltefosina, paromomicina, pentamidina e anfotericina B e seus derivados. Porém, estes apresentam pontos negativos na terapia, como os altos índices de desenvolvimento de resistência, os regimes de tratamento com altas doses por longos períodos, administração parenteral, além de elevada toxicidade e outras limitações desta terapia (PLANO et al., 2011).

Portanto, para minimizar esses efeitos, é importante realizar experimentos usando produtos naturais para a descoberta de compostos menos tóxicos, já que há uma grande diversidade de plantas com efeitos ativos já comprovados e que servir como base para o desenvolvimento de novos medicamentos na pesquisa farmacêutica. As espécies utilizadas *Schinus terebinthifolius*, *Phyllanthus niruri*, *Mentha peperita*, *Matricaria racutita*, *Maytenus ilicifoliae* *Syzygium jambolanum* estão presentes na lista do RENISUS.

Os objetivos do trabalho foram: determinar a citotoxicidade dos produtos naturais para a célula hospedeira (macrófagos), além de verificar a ação dos mesmos sobre macrófagos infectados com *Leishmania spp.* quanto à taxa de infecção e a multiplicação dos parasitas intracelulares (amastigotas de *Leishmania spp.*) Identificar a seletividade dos produtos naturais para diferentes espécies do gênero *Leishmania* e avaliar o efeito desses produtos naturais sobre macrófagos infectados com *Leishmania spp.* quanto à produção de óxido nítrico (NO).

Metodologia

Manutenção de linhagem macrófagos: Macrófagos da linhagem J774.A1 foram mantidos em garrafas de cultura em 5 ml de meio RPMI com soro. Onde , as células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB na concentração de 1 x 10⁵ células/mL e 200 µL dessa suspensão foi distribuída

em placa de 96 poços ou 1 x 10⁵ células /poço de placa de 24 poços com lamínulas.

Determinação da viabilidade celular: Macrófagos da linhagem J774.A1 foram cultivados em triplicatas em placas de 96 poços, na concentração de 1,5 x 10⁵ células/poço e incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂ por 1 hora, para adesão dos macrófagos ao plástico. Em seguida, os poços foram lavados para remoção das células não aderentes onde foram acrescentadas as diferentes concentrações das substâncias testadas. Os poços controles foram células cultivadas somente com meio de cultura e 10% de SFB (Roche) ou células cultivadas na presença do diluente das substâncias (DMSO, Sigma). A viabilidade celular foi determinada ensaio de redução de MTT (MOSMANN et al., 1993). A viabilidade celular das culturas tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte obtido nas culturas controle.

Avaliação da carga parasitária in vitro: Os macrófagos cultivados em placas de 24 poços foram infectados com formas promastigotas na fase estacionária de crescimento, numa proporção de 10 parasitos: 1 macrófago. A placa foi incubada por 4 horas em estufa de a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. Após 4 horas de infecção, os macrófagos foram “lavados” com Hanks’ sem soro, para remoção dos parasitos não interiorizados. Os macrófagos foram cultivados com RPMI suplementado com 10% de SFB, na presença ou não de diferentes concentrações do(s) composto(s) e foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO₂ por 2 dias. Após o segundo dia de cultura, os poços contendo os macrófagos infectados foram lavados com Hanks’ sem soro, as células foram fixadas com metanol e em seguida coradas com Giemsa e May-Grünwald e montadas sobre lâminas. A avaliação do número de macrófagos infectados e o número de amastigotas em 100 macrófagos. Este ensaio foi realizado para determinação da atividade leishmanicida de diversas espécies do gênero *Leishmania*, para determinação da seletividade para espécies dermatrópicas e viscerotrópicas.

Dosagem do óxido nítrico: Os sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados e cultivados ou não na presença do(s) composto(s) foram coletados e mantidos a -20 °C até o momento da utilização. A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada indiretamente pela medida da produção de nitrito (NO₂⁻) no sobrenadante das culturas. A concentração de nitrito foi determinada através de reação colorimétrica de Griess. Resumidamente, 50 µl do reagente de Griess onde foi adicionados a 50 µl do sobrenadante e após 10min. a TA a absorvância foi determinada (filtro de 540nm) em leitor de ELISA.

Resultados e Discussão

No presente trabalho foi feito a determinação da citotoxicidade das plantas medicinais; *Schinus terebinthifolius*, *Phyllanthus niruri*, *Mentha peperita*, *Matricaria racutita*, *Maytenus ilicifolia* e *Syzygium jambolanum*, disponíveis na lista RENISUS, utilizando células de macrófagos da linhagem J744.A1.

Com o intuito de verificar uma possível atividade leishmanicida com as amostras das plantas medicinais testadas, foi calculada a concentração inibitória 50% (CI₅₀), o efeito máximo e o índice de seletividade das espécies de plantas, assim como dos fármacos padrões pentamidina, antimoniato de meglumina (Glucantime®) e miltefosina, contra a forma amastigotas de *L. amazonensis*. Esses resultados evidenciaram que nenhuma das plantas testadas apresentaram efeito leishmanicida com a concentração máxima utilizada (100 µg/mL), ao contrário dos fármacos-padrões utilizados miltefosina (CI₅₀ igual à 22,1 µM) e pentamidina (CI₅₀ igual à 19,4 µM). O antimoniato de meglumina apresentou uma CI₅₀ acima de 100 µM.

O NO resultante da ativação dos macrófagos possui grande ação citotóxica e combinando-se ao peróxido de hidrogênio ou ao superóxido, gerados pela oxidase fagocitária, produzem radicais de peroxinitrito promovendo a morte de microorganismos no interior dos fagolisossomos (DUSSE et al, 2003; Abbas et al, 2011). As promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* são sensíveis a ação do NO, mostrando uma citotoxicidade dose dependente, sendo as promastigotas mais sensíveis do que as amastigotas (GENESTRA et al, 2008).

O tratamento dos macrófagos J774.A1 infectados com a forma amastigota do parasito, levou à secreção de quantidades significativas de NO para a maioria das espécies vegetais testadas, quando comparadas com os fármacos padrões pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina, destacando *Phyllanthus niruri*, *Mentha peperita*, *Matricaria racutita* e *Maytenus ilicifolia*, que tiveram concentrações de excreção de nitrito maiores que 20,0 µM.

Conclusões

A partir dos dados obtidos neste trabalho pode-se concluir que, nenhuma das plantas medicinais utilizadas apresentaram citotoxicidade para os macrófagos até a máxima concentração testada (100 µM), sem causar prejuízo contra a célula hospedeira. Além disso, essas plantas também não demonstraram atividade contra de *L. amazonensis*, apesar da maioria das plantas medicinais estudadas induzirem o aumento significativo dos níveis de óxido nítrico. Futuros estudos devem ser realizados para verificar que essas plantas são inativas contra outras espécies de *Leishmania*.

Referências bibliográficas

1. ABBAS, A.K.; Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular*. 7ª ed. Elsevier, 2011.
2. BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Leishmaniose Tegumentar Americana**. 1.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
3. DUSSE, L.M.S.; VIEIRA, L.M.; CARVALHO, M.G. **Revisão sobre óxido nítrico**. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003; 39 (4): 343- 50.
4. GENESTRA M, Soares-Bezerra RJ, Gomes-Silva L, Fabrino DL, Bellato-Santos T, CastroPinto DB et al. **In vitro mediated toxicity towards Leishmania amazonensis promastigotes and axenic amastigotes**. *Cell Biochem Funct* 2008; 26:709-717.
5. MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays**. *J. Immunol. Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
6. NUNES, M.P.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; MONTEIRO, B.C. et al. **CD40 signaling induces reciprocal outcomes in Leishmania-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu**. *Micro. Infect.*, v. 7, n. 1, p. 78-85, 2005.
7. NYLÉN, S.; EIDSMO, L. **Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis**. *Parasite Immunol.*, v. 34, p. 551–561, 2012. OLIVEIRA, L.F. et al. **Systematic Review of the Adverse Effects of Cutaneous Leishmaniasis Treatment in the New World**. *Acta Trop.*, v.118, p 87-96, 2011.
8. OMS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas**. Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2017. Disponível em:http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754.
9. PLANO, D.; BAQUEDANO, Y.; MORENO-MATEOS, D.; FONT, M.; JIMÉNEZ-RUIZ, A.; PALOP, J. A.; SANMARTÍN, C. **Selenocyanates and diselenides: a new class of potent antileishmanial agents**. *Eur J MedChem*,v.46, p. 3315, 2011.