

Subárea do item 7 das Normas de Submissão de Trabalho: 2.10.05 - Farmacologia / Farmacologia Bioquímica e Molecular

### **ESTUDO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE *Morus Alba*, *Vernonia spp.*, *Cynara scolymus*, *Passiflora alata*, *Stryphnodendron adstringens* E *Equisetum arvense***

Lilyana Waleska Nunes Albuquerque<sup>1\*</sup>; Magna Suzana Alexandre Moreira<sup>2</sup>; Aline Cavalcanti de Queiroz<sup>2,3</sup>

1. Estudante de IC do Laboratório de Farmacologia e Imunidade – ICBS, UFAL
2. Pesquisador do Laboratório de Farmacologia e Imunidade – ICBS, UFAL
3. Orientador

#### **Resumo**

As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas causadas por parasitos protozoários de mais de 20 espécies de *Leishmania*. Apesar da sua importância epidemiológica, os mecanismos de controle da doença são limitados. Deste modo, o desenvolvimento e avaliação farmacológica de substâncias candidatas a fármacos leishmanicidas e imunomoduladores mais eficazes e de menor custo, tornam-se indispensáveis para o tratamento desta patologia. O presente estudo analisou o efeito leishmanicida do extrato aquoso de plantas medicinais de interesse do SUS, *Morus Alba*, *Vernonia spp.*, *Cynara scolymus*, *Passiflora alata*, *Stryphnodendron adstringens* e *Equisetum arvense*, bem como investigou o mecanismo de ação do(s) produto(s) natural(is) mais ativo(s), com intuito de descobrir novos candidatos a fármacos leishmanicidas. Determinou-se a citotoxicidade e efeito leishmanicida dos produtos naturais, assim também como o seu efeito e seletividade para os parasitos, e por fim, a sua influência no aumento dos níveis de óxido nítrico (NO) em cultura de macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*.

**Autorização legal:** Por ser um estudo *in vitro* para avaliação de produtos naturais, não há necessidade de expedição de autorizações junto a Comitês de Ética ou Órgãos Ambientais.

**Palavras-chave:** *Leishmania*. Imunomodulador. Plantas medicinais.

**Apoio financeiro:** FAPEAL, CNPq, INCT-INOVAR, CAPES, FAPERJ

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UFAL

#### **Introdução**

A leishmaniose é uma parasitose encontrada em 98 países, acometendo cerca de 1,3 milhões de pessoas por ano. No Brasil é de elevada incidência, apresentando no decorrer dos anos uma tendência crescente. (WHO, 2014).

Os objetivos deste trabalho foram: determinar a citotoxicidade de produtos naturais para a célula hospedeira do parasito (macrófagos); através do ensaio de viabilidade celular, verificar a ação desses produtos sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis* quanto à taxa de infecção e a multiplicação dos parasitos intracelulares (amastigotas); identificar a seletividade dos produtos naturais para espécie *L. amazonensis* e avaliar o efeito desses produtos naturais sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis* quanto a produção de óxido nítrico.

Os resultados do estudo sugerem que nenhum dos produtos naturais apresentaram efeito deletério aos macrófagos. Além disso, quanto ao efeito leishmanicida, *Equisetum arvense* apresentou  $CI_{50}$  significativa de 82,3  $\mu$ g/mL e um efeito máximo de 51,8%, sendo >1,2 vezes mais seletiva para amastigota de *L. amazonensis* do que para o macrófago. *Stryphnodendron adstringens* apresentou um efeito máximo de 66,9%. Quanto ao aumento dos níveis de nitrito em cultura de macrófagos infectados com o parasito, *Cynara scolymus*, *Passiflora alata* e *Stryphnodendron adstringens* apresentaram resultados significantes, sugerindo que há liberação de óxido nítrico por essas plantas.

Destaca-se a importância de estudos com plantas medicinais, pela possibilidade de explorar recursos naturais, que são extremamente abundantes no Brasil, devido à biodiversidade que nele há, além de ser uma fonte economicamente acessível para atender as necessidades que cercam a problemática das doenças negligenciadas.

#### **Metodologia**

Para a manutenção de linhagem de macrófagos, foram utilizados macrófagos da linhagem J774.A1 mantidos em garrafas de cultura em 5 ml de meio RPMI com soro. As células foram contadas, ajustadas em meio RPMI suplementado com 10% de SFB na concentração de  $1 \times 10^5$  células/mL e 200  $\mu$ L dessa suspensão foram distribuídas em placa de 96 poços (Nunc, Denmark) ou  $1 \times 10^5$  células /poço de placa de 24 poços com lamínulas.

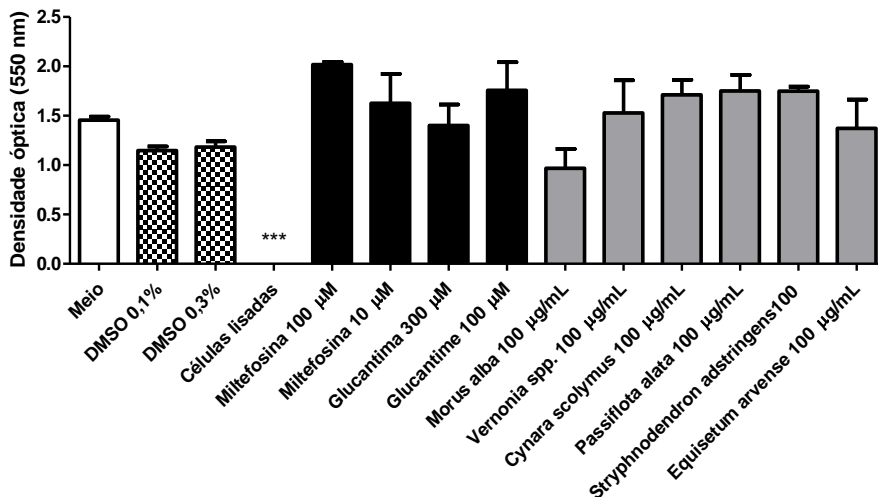
A determinação da viabilidade celular se deu através de macrófagos cultivados em triplicatas em placas de 96 poços, na concentração de  $1,5 \times 10^5$  células/poço e incubadas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO<sub>2</sub> por 1 hora, para adesão dos macrófagos ao plástico. Em seguida, os poços foram lavados para remoção das células não aderentes e acrescentadas as diferentes concentrações do extrato aquoso dos produtos naturais. 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 através do 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.

Quanto a 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 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO<sub>2</sub>. 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 mantidos em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 7% de CO<sub>2</sub> 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, foi feita com auxílio de microscópio óptico com objetiva de 100X (imersão) (NUNES et al., 2005).

Para a dosagem de 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 (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) no sobrenadante das culturas. A concentração de nitrito foi determinada através de reação colorimétrica de Griess. Resumidamente, 50 µl do reagente de Griess serão adicionados a 50 µl do sobrenadante e após 10 min. e a absorvância foi determinada (filtro de 540nm) em leitor de ELISA.

## Resultados e Discussão

Inicialmente, os efeitos das plantas da RENISUS foram analisados através da investigação do potencial citotóxico em macrófagos da linhagem J774.A1, via método de MTT. O ensaio de citotoxicidade foi realizado com as plantas *Morus alba*, *Vernonia spp*, *Cynara scolymus*, *Passiflora alata*, *Stryphnodendron adstringens* e *Equisetum arvense*, sendo estas de interesse ao Sistema Único de Saúde (SUS), além dos fármacos padrão, Miltefosina e Glucantime (Antimoniato de meglumina). (Figura 1)



**Figura 1.** Efeito citotóxico de plantas da RENISUS, pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina em macrófagos da linhagem J774.A1. Média do efeito máximo ± erro padrão em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de eficácia máxima foram considerados significativos quando \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%.

De acordo com a figura 1, os resultados demonstraram que as plantas *Morus alba*, *Vernonia spp.*, *Cynara scolymus*, *Passiflora alata*, *Stryphnodendron adstringens* e *Equisetum arvense* na concentração de 100 µg/mL não apresentaram efeito citotóxico para os macrófagos, quando comparadas ao controle (células cultivadas apenas com meio de cultura).

Posteriormente, determinou-se a CI<sub>50</sub> (concentração inibitória) dos fármacos padrão pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina e das plantas *Morus alba*, *Vernonia spp.*, *Cynara scolymus*, *Passiflora alata*, *Stryphnodendron adstringens* e *Equisetum arvense*, respectivamente, sobre amastigotas de *L. amazonensis*.

**Tabela 1.** Efeito leishmanicida de plantas da RENISUS, pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina contra amastigotas de *L. amazonensis*.

Substância	CI <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup>	Efeito Máximo (%) <sup>b</sup>	Índice de seletividade <sup>c</sup>
Pentamidina	19,4 ± 0,4 µM	68,4 ± 4,4 ***	1,8
Antimoniato de meglumina	251,3 ± 3,7 µM	66,9 ± 1,4 ***	>1,9
Miltefosina	22,1 ± 1,8 µM	91,0 ± 0,4 ***	>4,5
<i>Morus Alba</i>	>100 µg/ml	NA	-
<i>Vernonia spp.</i>	>100 µg/ml	NA	-
<i>Cynara scolymus</i>	>100 µg/ml	NA	-
<i>Passiflora alata</i>	>100 µg/ml	NA	-
<i>Stryphnodendron adstringens</i>	>100 µg/ml	66,9 ± 1,4 ***	-
<i>Equisetum arvense</i>	82,3 ± 1,5 µg/mL	51,8 ± 0,3 ***	>1,2

<sup>a</sup> Concentração Inibitória de 50% calculada através de curvas concentração-resposta; <sup>b</sup> média do efeito máximo ± erro padrão em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de eficácia máxima foram considerados significativos quando \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%; <sup>NA</sup> substância não apresenta atividade significativa em relação ao grupo DMSO 0,1%; <sup>c</sup> índice de seletividade para amastigotas *L. amazonensis* em relação a macrófagos da linhagem J774.A1.

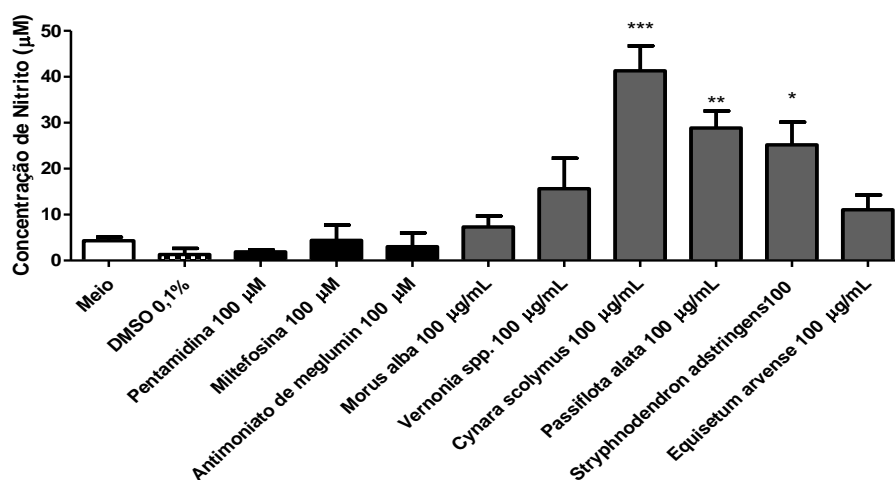
Os resultados demonstram que *Equisetum arvense* apresentou uma CI<sub>50</sub> significativa de 82,3 µg/mL, muito inferior ao fármaco controle antimoniato de meglumina, que apresentou uma CI<sub>50</sub> de 251,3 µM. Observou-se que *Morus alba*, *Vernonia spp.*, *Cynara scolymus* e *Passiflora alata*, até a maior concentração testada (100 µg/mL), não induziram inibição igual ou superior de 50% na proliferação de *L. amazonensis*.

Além disso, frente a concentração máxima utilizada nos experimentos, 100 µg/mL, as plantas *Stryphnodendron adstringens* e *Equisetum arvense* apresentaram efeito máximo de 66,9% e 51,8%, respectivamente, sendo este efeito máximo semelhante aos fármacos controle pentamidina e antimoniato de meglumina. É importante mencionar que as demais plantas testadas não apresentaram atividade até a concentração máxima testada.

O índice de seletividade é um parâmetro crucial na investigação de substâncias leishmanicidas, pois ele pressupõe o quanto seu efeito citotóxico será seletivo para o parasito, sem implicar na morte da célula hospedeira. Os resultados do índice de seletividade apresentados na Tabela 1 mostraram que *Equisetum arvense* é >1,2 vezes mais seletiva para leishmanias do que para os macrófagos. O índice de seletividade não pôde ser calculado para as demais plantas, pois elas não apresentaram CI<sub>50</sub> significativa para o parasito.

Por fim, investigou-se o efeito de plantas da RENISUS, pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina no que se refere ao seu mecanismo de ação associado à liberação de óxido nítrico, através do aumento dos níveis de nitrito em cultura de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*.

**Figura 2.** Efeito de plantas da RENISUS, pentamidina, antimoniato de meglumina e miltefosina no aumento dos níveis de nitrito em cultura de macrófagos infectados com amastigotas de *L. amazonensis*.



O óxido nítrico tem um importante papel no controle de muitas infecções, apresentando atividade antibacteriana, antiparasitária e antiviral (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2002). Essa atividade antiparasitária deve-se ao fato do óxido nítrico ser uma molécula determinante na atuação dos macrófagos na defesa contra *Leishmania*, desenvolvida em resposta Th1.

O mecanismo molecular pelo qual óxido nítrico exerce a sua atividade citotóxica não é completamente compreendido. Alguns estudos têm proposto que os efeitos do óxido nítrico são devidos a inibição da respiração mitocondrial, glicólise, peroxidação de lípidos da membrana, inativação de peroxidases e arginases, perturbações de agregados de Fe-S e mutação do DNA e/ou a inibição da síntese e reparo do DNA (MAUEL e RANSIJN, 1997; GRADONI e ASCENZI, 2004).

Após análise dos dados obtidos, nota-se na figura 2 que *Cynara scolymus*, *Passiflora alata* e *Stryphnodendron adstringens* induziram significativamente o aumento dos níveis de nitrito em cultura de macrófagos infectados com o parasito, logo, prediz-se que há liberação de óxido nítrico por essas plantas, numa concentração de 100 µg/mL.

## Conclusões

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que nenhuma das plantas da RENISUS analisadas apresentaram efeito deletério para a célula hospedeira na concentração testada. Além disso, a planta *Equisetum arvense* obteve uma  $CI_{50}$  significativa de 82,3 µg/mL e um efeito máximo de 51,8%. Apesar de não ter sido possível calcular a  $CI_{50}$ , a planta *Stryphnodendron adstringens* apresentou um efeito máximo de 66,9%. No que se refere ao índice de seletividade, apenas a planta *Equisetum arvense* foi passível ao cálculo, apresentando-se >1,2 vezes mais seletiva para amastigota de *Leishmania amazonensis* do que para o macrófago. Quanto a liberação de óxido nítrico, observou-se que *Cynara scolymus*, *Passiflora alata* e *Stryphnodendron adstringens* apresentaram efeitos significantes na concentração de 100 µg/mL.

Desta forma, é importante mencionar que esses estudos dão suporte à pesquisa de produtos naturais ativos contra parasitos de leishmania, expandindo a busca por novas opções terapêuticas no tratamento da leishmaniose, o que possibilita realizar posteriormente uma investigação detalhada de seu mecanismo de ação, o estudo dessas plantas frente a parasitos de outras espécies causadoras de leishmaniose e por fim, viabilizando estudos fitoquímicos e biológicos para o isolamento e identificação de novos esqueletos moleculares que possam servir na concepção de moléculas ativas.

## Referências bibliográficas

- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin. Exp. Dermatol.**, v. 35, p. 699–705, 2010.
- DEN-BOER, M.; ARGAW, D.; JANNIN, J.; et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, p. 1471–1477, 2011.
- FANG FC: Perspectives series: host/pathogen interactions. Mechanisms of nitric oxide-related antimicrobial activity. *J Clin Invest* 1997, 99:2818-2825.
- GIUDICE, A et al. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infectious Diseases*, v. 7, n. 7, fev. 2007. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/1471-2334/7/7>>. Acesso em: 12 ago. 2018.
- GRADONI, L.; ASCENZI, P. Nitric oxide and anti-protozoan chemotherapy. *Parassitologia*, v. 46, p. 101–103, 2004.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. of Anti-Inf. T.*, v.8, p.419-433, 2010.
- FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista Associação Médica Brasileira**. Online. Disponível na Internet: [http://w.../scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=SO104-42302000000300012&1ng=pt&nrm=is](http://w.../scielo.php?script=sci_arttext&pid=SO104-42302000000300012&1ng=pt&nrm=is).
- MAUEL, J.; RANSIJN, A. *Leishmania* spp.: mechanisms of toxicity of nitrogen oxidation products. **Exp. Parasitol.**, v. 87, p. 98–111, 1997.
- MOSMANN, T.. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, v. 65:55-63, 1983.
- WHO. Leishmaniasis: disease burden and epidemiological trends. Special Programme for research and Training in Tropical Diseases. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/direction.pdf>>. Acesso em 22 de julho de 2017.