

2.10.99 - Farmacologia.

## INVESTIGAÇÃO DO MECANISMO DE AÇÃO DE UM DERIVADO SINTÉTICO DA CLASSE DAS N-ACILHIDRAZONAS EM INIBIR A INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS POR *Leishmania amazonensis*

Dahara K. C. Silva<sup>1,2 \*</sup>, Jessica da S. Teixeira<sup>1,2</sup>, Tatiana B. dos Santos<sup>3</sup>, Cássio S. Meira<sup>4</sup>, Tiago F. Silva<sup>5</sup>, Diogo R. M. Moreira<sup>6</sup>, Eliezer J. Barreiro<sup>7</sup>, Milena B. P. Soares<sup>8</sup>, Elisalva T. Guimarães<sup>9</sup>

1. Estudante de IC do DCV, UNEB

2. Estudante de IC do IGM, FIOCRUZ-BA

3. Mestranda em Ciências Farmacêuticas da UNEB-BA

4. Pesquisador colaborador do IGM, FIOCRUZ-BA

5. Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Química da UFRJ

6. Pesquisador em Saúde Pública do LETI do IGM, FIOCRUZ-BA

7. Pesquisador Coordenador do LASSBio, UFRJ, Rio de Janeiro

8. Pesquisadora Chefe do LETI do IGM, FIOCRUZ-BA e do CBTC do Hospital São Rafael.

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

### Resumo

A leishmaniose é um problema de saúde pública e seu tratamento possui limitações. Logo, a busca de novos fármacos torna-se relevante. Estudos prévios do nosso grupo demonstram uma promissora atividade imunomoduladora do LASSBio-1386, um derivado sintético da classe das N-acilhidrazonas. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade e os possíveis mecanismos de ação do composto frente a infecção por *Leishmania amazonensis*. O efeito do LASSBio-1386 na infecção de macrófagos foi avaliado através de microscopia óptica, de fluorescência e por microscopia eletrônica de transmissão. A ação do composto no ciclo celular de promastigotas foi avaliada por citometria de fluxo e seu efeito também foi avaliado em modelo murino de leishmaniose cutânea. O composto reduziu a infecção de macrófagos, provocou alterações ultraestruturais em amastigotas e causou parada nas fases G0/G1. Por fim, reduziu a infecção de camundongos. Esses dados demonstram um perfil antileishmania do composto.

**Autorização legal:** Protocolo de procedimento CEUA 018/2015 aprovado e licenciado pela Comissão de Ética no uso de Animais pelo IGM.

**Palavras-chave:** Tratamento; Leishmaniose; LASSBio-1386.

**Apoio financeiro:** CNPQ, Fapesb, IGM e UNEB.

**Trabalho selecionado para a JNIC:** UNEB

### Introdução

A leishmaniose é um problema de saúde pública no Brasil. Estima-se que 12 milhões de pessoas estão infectadas pelo parasito no mundo (OMS, 2012). Apesar dos avanços na imunopatologia da doença, o seu tratamento possui diversas limitações, como efeitos adversos sistêmicos, elevada toxicidade e alto custo. Diante desses dados, a busca de novos fármacos torna-se relevante. As hidrazonas são uma classe de compostos orgânicos sintéticos que apresentam descrições na literatura de diversas atividades biológicas como: antimicrobiana e antifúngica (APOTROSOAEI *et al.*, 2013), anti-inflamatória e analgésica (BARREIRO *et al.*, 2002; ALAM *et al.*, 2012; HAMDY *et al.*, 2013), e antitumoral (MU, 2016).

Estudos prévios do nosso grupo no Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) da Fiocruz-BA demonstram uma atividade imunomoduladora promissora do derivado da classe das N-acilhidrazonas, o (E)-N-(3,4-dimetoxibenzilideno)-4-metoxibenzohidrazida (LASSBio-1386). O LASSBio-1386 inibiu a resposta imune e inflamatória, provavelmente através da inibição da via do NFκB, em ensaios *in vitro* e em modelo murino de choque endotóxico e de hipersensibilidade tardia (GUIMARÃES *et al.*, 2018). Além disso, em estudos recentes do nosso grupo de pesquisa, o LASSBio-1386 apresentou importante atividade antileishmania *in vitro* contra formas promastigotas de *L. amazonensis* (CI<sub>50</sub>=0,80 ± 0,16 µg mL<sup>-1</sup>). O composto LASSBio-1386 apresentou um baixo valor de citotoxicidade (CC<sub>50</sub> de 17,99 ± 1,3 µg mL<sup>-1</sup>) quando comparado à violeta de genciana (CC<sub>50</sub>= 0,3 ± 0,04 µg mL<sup>-1</sup>), droga citotóxica de referência. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis mecanismos de ação do LASSBio-1386 frente a infecção por *Leishmania amazonensis*.

### Metodologia

Inicialmente, o efeito do LASSBio-1386 na infecção de macrófagos por *L. amazonensis* foi avaliado através da contagem em microscópio óptico e por microscopia de fluorescência. Macrófagos da linhagem J774 foram cultivados em placas de 24 poços (2 x 10<sup>5</sup>/poço) e infectados com *L. amazonensis* em fase estacionária, na razão de 10 parasitos por macrófago. Após 4h de infecção, os compostos foram adicionados aos poços. Após 24 horas, as células foram fixadas em metanol e coradas por GIEMSA. A porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófagos foram determinados pela contagem de 100 células em campos

aleatórios. Além disso, também foi realizada a microscopia de fluorescência, para isso macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram cultivados em placas de 24 poços (5 x 10<sup>5</sup>/poço) e mantidos por 24 h em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, foram infectados com *L. amazonensis* em fase estacionária, na razão de 10 parasitos por macrófago. Após 4h de infecção, o composto foi adicionado aos poços durante 24 horas a 37°C. Após esse período, as lâminas foram fixadas com metanol e marcadas com DAPI (4',6 - diamidino diamidino-2- fenil-indol) na concentração de 1,5 µg/mL por 5 minutos e analisadas através de microscópio de fluorescência (Leica DMi8). Também verificou-se a atividade do composto frente as formas amastigotas por microscopia eletrônica de transmissão. Macrófagos peritoneais de BALB/c (3 x 10<sup>6</sup>/poço) infectados por *L. amazonensis* foram tratados com o composto durante 24 horas a 37°C. Após a incubação, os parasitos foram fixados por 1 h à temperatura ambiente com formaldeído a e glutaraldeído. Após a fixação, pós-fixação e desidratação, as amostras foram embebidas em resina Polybed. As imagens foram coletadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL TEM-1230. A interferência do composto no ciclo celular de promastigotas também foi avaliada. Promastigotas de *L. amazonensis* (1 x 10<sup>6</sup>) foram incubados em placas de 24 poços e após 48 h de tratamento com os compostos em estudo, adicionou-se a solução de lise contendo o PI (2 µg mL<sup>-1</sup>) e 0,1% v v<sup>-1</sup> de triton X-100, na ausência de luz e a 37°C. Após 30 minutos, as células foram adquiridas e analisadas em citometro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson Biosciences, San José, CA, EUA) através do software CellQuest. Além disso, avaliou-se o efeito do LASSBio-1386 em modelo murino de leishmaniose cutânea. Os camundongos da linhagem BALB/c foram infectados com *L. amazonensis* por via subcutânea na derme da orelha direita. Após 2 semanas de infecção, grupos de camundongos foram tratados diariamente durante cinco semanas, por via tópica, com 1% m m<sup>-1</sup> do creme do LASSBio-1386. O desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente usando um paquímetro digital. A quantificação parasitária foi realizada através da diluição limitante dos linfonodos dos camundongos infectados tratados ou não com o composto.

### Resultados e Discussão

O LASSBio-1386 provocou uma redução significativa do percentual de macrófagos infectados nas concentrações de 10 e 15 µg mL<sup>-1</sup>. Já em relação ao número de amastigotas por macrófagos, o composto foi capaz de inibir de forma significativa em todas as concentrações. A anfotericina B, testada na concentração de 5 µg mL<sup>-1</sup> foi capaz de reduzir de forma significativa tanto a infecção quanto o número de amastigotas por macrófagos, como já esperado. Este dado foi ratificado por análise em microscopia de fluorescência. Houve redução do número de amastigotas intracelulares e do número de macrófagos infectados, quando comparado com o controle infectado, mas não tratado. Além disso, as alterações ultraestruturais foram avaliadas com a finalidade de verificar se há influência direta da molécula em estudo nas organelas do parasito. Mitocôndria, núcleo e cinetoplasto aparecem preservadas nas formas amastigotas presentes no grupo controle infectado mas não tratado. Dentre as alterações que surgiram com o tratamento, encontram-se desorganização do citoplasma, aumento de cinetoplasto, inclusões lipídicas e possível formação de autofagossomo. O LASSBio-1386 foi capaz de alterar o ciclo celular causando parada nas fases G0/G1 do ciclo celular. O tratamento tópico diário do LASSBio-1386 causou uma redução significativa na espessura na orelha de camundongos infectados, especialmente na quinta semana, quando comparado com o grupo controle que foi infectado, mas não tratado. Além disso, verificou-se também uma redução da carga parasitária após a quinta semana de tratamento. Apesar da redução da carga parasitária, o composto não foi capaz de promover a cura dos camundongos tratados.

### Conclusões

Os resultados demonstram que o LASSBio-1386 possui uma promissora atividade antileishmania *in vitro* e *in vivo*, com provável ação direta no parasito e parada no ciclo celular nas fases G0/G1.

### Referências bibliográficas

- ALAM, M.M.;MYMOONA, A.; ASIF, H.; AKRANTH, M.; OM, P.T.; RAHMAT, A.; SYED, M.H.; HARISH, K.; RASHIDUDDIN, H.; MOHAMMAD, S. Anti-inflammatory and antimicrobial activity of 4, 5-dihydropyrimidine-5-carbonitrile derivatives: their synthesis and spectral elucidation. **Acta poloniae pharmaceutica**, v. 69, n. 6, p. 1077-1085, 2012.
- APOTROSOAEI, M.; VASINCU, I.; TUCHILUS, C.; LUPASCU, F.; CONSTANTIN, S.; LUPASCU, D.; PROFIRE, L. New hydrazones with pyrazolone structure: synthesis, characterization and biological evaluation. **Revista Medico-Chirurgicala a Societatii De Medici Si Naturalisti Dinlasi**, v. 117, n. 2, p. 538-544, 2013.
- BARREIRO, E.J.; FRAGA, C. A.; MIRANDA, A. L.; RODRIGUES, C.R. A química medicinal de N-acilidrazonas: Novos compostos-protótipos de fármacos analgésicos, antiinflamatórios e anti-trombóticos. **Química Nova**, v. 25, n. 1, p. 129-148, 2002.
- GUIMARÃES, E. T., DOS SANTOS, T. B., SILVA, D. K. C., MEIRA, C. S., MOREIRA, D. R. M., DA SILVA, T. F., SALMON, D., BARREIRO, E.J., SOARES, M. B. P. Potent immunosuppressive activity of a phosphodiesterase-4 inhibitor N-acylhydrazone in models of lipopolysaccharide-induced shock and delayed-type hypersensitivity reaction. **International immunopharmacology**, v.65, p.108-118, 2018.
- HAMDY, N.A.; ABDEL-AZIZ, H.A.; KAMEL, G.M.; FAKHR, I.M. Convenient synthesis, anti-inflammatory, analgesic and ulcerogenic activities of some new bis-hydrazones and pyrazole derivatives. **Acta Poloniae Pharmaceutica**, v. 70, p. 469-480, 2013.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Geneva, 2012.

Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/about/en/>>. Acesso em 15 de janeiro de 2019.

MU, J. X.; SHI, Y. X.; WU, H. K.; SUN, Z. H.; YANG, M. Y.; LIU, X. H.; LI, B. J.; Microwave assisted synthesis, antifungal activity, DFT and SAR study of 1,2,4- triazolo[4,3-a]pyridine derivatives containing hydrazono moieties. **Chemistry Central Journal**. 2016. 10. 50(1-9).