



Eficácia *in vitro* de um complexo paladíciclo contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Palavras-Chave: Leishmaniose, DPPE 1.2, Paladíciclo.

Autores:

Lucas Aguilar Collarile – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unicamp

Marcus Sávio Araujo Garcia – Instituto de Biologia, Unicamp

Prof. Dr. Danilo Ciccone Miguel – Instituto de Biologia, Unicamp

INTRODUÇÃO:

A leishmaniose é uma doença causada por parasitas do gênero *Leishmania* pertencentes à família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, tendo como vetores os flebotomíneos (Diptera, Psychodidae), também conhecidos como “mosquito-palha”, “birigui” e “tatuquira”, encontrados em regiões tropicais e subtropicais (1). Para que ocorra a transmissão do parasita, é necessário que flebotomíneos fêmeas realizem o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados. As formas promastigotas do parasito, encontradas no sistema digestivo dos insetos se diferenciam em amastigotas após adentrarem células fagocitárias de organismos vertebrados (2).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que a leishmaniose afeta 12 milhões de pessoas no mundo com aproximadamente 52 mil novos casos por ano e média anual de 2.488 mortes (3).

Dependendo da espécie, os parasitas causadores da leishmaniose induzem diferentes manifestações clínicas da doença, sendo três principais: a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), caracterizada pelo surgimento de úlceras geralmente localizadas no local da picada do vetor; a Leishmaniose Mucocutânea (LMC), uma das formas mais graves da leishmaniose, onde há o comprometimento de mucosas e estruturas cartilaginosas na garganta, narinas e boca pode levar a deformidades; e a Leishmaniose Visceral (LV) afeta órgãos como o baço e o fígado, podendo causar óbitos em pacientes não tratados (4).

No Brasil, *Leishmania (Viannia) braziliensis* é encontrada em todo país, sendo mais comum na região Nordeste e Sudeste, sendo responsável pela LCL e LMC (5). O enfoque do projeto será dado a esta espécie, considerando a sua prevalência no Brasil e sua importância epidemiológica no país.

Apesar da variabilidade entre as espécies de *Leishmania* e seus respectivos quadros clínicos, o tratamento utilizado há mais de 70 anos consiste no uso de antimoniais pentavalentes (Sb-V) como fármacos de primeira escolha (6). Entretanto, a alta toxicidade do medicamento implica em efeitos colaterais como: febre, náusea, vômito, dor muscular e nas articulações, hepato e nefrotoxicidade. Além disso, a necessidade de monitoramento

do paciente e o longo período de administração do fármaco por via parenteral gera pouca adesão ao tratamento ou abandono do mesmo, aumentando a possibilidade de resistência ao medicamento (7).

Recentemente, complexos de paládio (Pd) se tornaram promissores como agentes antiparasitários contra diversas doenças. O composto ciclopaladado DPPE 1.2 apresentou $EC_{50} = 2,13$ nM contra promastigotas de *L. (Leishmania) amazonensis*, apresentando $EC_{50} = 128,35$ nM em infecções *in vitro*. Além disso, estudos *in vivo* com DPPE 1.2 indicaram diminuição de carga parasitária de 97% quando comparados ao grupo controle (8).

O Laboratório de Estudos de Biologia da Infecção por *Leishmania* (LEBIL – IB – UNICAMP), sob coordenação do Prof. Danilo C. Miguel, tem realizado estudos promissores com metalocomplexos contendo Au(I), Au (III), Ag (I), Cu (I) e Cu (II) em *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. Considerando as informações apresentadas, é extremamente relevante a realização de estudos com possíveis candidatos leishmanicidas menos tóxicos e mais eficazes. O complexo DPPE 1.2 foi testado e apresentou valores significativos contra *L. (L.) amazonensis*. Este projeto visa avaliar a eficácia do DPPE 1.2 contra *L. (V.) braziliensis*, visto que é a espécie de maior relevância no cenário nacional se tratando da LCL causadora da LMC no Brasil.

METODOLOGIA:

O complexo paladociclo bifosfínico [Pd(C2, N-S(-)DMPA)(DPPE)]Cl (DPPE 1.2) foi cedido pela Prof^a Dra. Clara Barbieri da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). A *leishmania* possui duas principais morfologias: a forma promastigota, encontrada no sistema digestivo do flebotômico e a forma amastigota encontrada em células fagocíticas do hospedeiro vertebrado (9). Assim, os parasitas foram cultivados e tratados com diferentes concentrações do composto na forma promastigota. O composto também foi testado em macrófagos visando avaliar a citotoxicidade e em infecções *in vitro* no qual o parasito se diferencia em amastigota dentro da célula hospedeira.

Cultivo e viabilidade celular em promastigotas

As formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram cultivadas em garrafas de cultura de 25 cm² contendo 10mL de Meio 199, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 5% de urina. Os ensaios *in vitro* foram conduzidos em triplicatas biológicas, calculando-se médias +/- desvio padrão e repetidos duas vezes, a partir da incubação de promastigotas de fase logarítmica com concentrações decrescentes do composto (5, 2,5, 1,25, 0,62, 0,31, 0,15, 0,07, 0,03, 0,019, 0,009 e 0 µM). Os ensaios foram conduzidos por 24 h para avaliação da viabilidade pelo método do MTT e as concentrações efetivas para inibir 50% do crescimento de culturas parasitárias (EC_{50}) foram estabelecidas a partir de curvas de dose-resposta utilizando-se GraphPad Prism (©2022 GraphPad Software), conforme descrito por MINORI et al., 2020 (10).

Cultivo e citotoxicidade em células hospedeiras

Para a obtenção de macrófagos, foram extraídas amostras de medula óssea de fêmures e tíbias de camundongos fêmeas BALB/c. Estas células foram cultivadas para diferenciação em macrófagos em meio R2030 contendo: 250 mL de RPMI, 100 mL de soro fetal bovino, 150 mL de sobrenadante de fibroblastos L929 e

gentamicina. As placas foram mantidas a 37°C, com atmosfera de 5% CO₂. Após 4 dias, foram adicionados mais 5 mL do meio R2030. Ao fim de uma semana, os macrófagos diferenciados foram recolhidos e centrifugados a 1500 x rpm por 5 minutos a 4° C, ressuspensos em meio RPMI para contagem em câmara de Neubauer para que, posteriormente, fossem plaqueados a 5x10⁴ células por poço em placas de 96 poços. Ensaio de citotoxicidade foram conduzidos a partir do método de MTT para estabelecimento de curvas dose-resposta e cálculo de concentrações citotóxicas de DPPE 1.2 por 24 h para 50% das culturas (CC₅₀) utilizando-se GraphPad Prism (©2022 GraphPad Software). Os resultados obtidos foram comparados quanto ao índice de seletividade (IS) calculado para o composto (IS = CC₅₀/EC₅₀).

Infecções *in vitro*

Macrófagos primários de camundongos BALB/C foram infectados com *L. (V.) braziliensis* (MOI = 10) e incubados por 24 h com o composto DPPE 1.2. Após esse tempo, as infecções foram contadas em relação ao número de amastigotas e células infectadas para a produção dos gráficos de taxa de infecção e carga parasitária, multiplicando esses dois fatores para obtenção de índice de seletividade. Os resultados foram calculados em relação ao controle não tratado em um experimento independente realizado em triplicata utilizando o programa GraphPad Prism. Ensaio com animais de experimentação realizados no LEBIL são aprovados pela CEUA-UNICAMP segundo o protocolo vigente n. 6022-1/2022.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Em relação aos testes de viabilidade com promastigotas (**Tabela 1**), foi encontrada EC₅₀ no valor de 0,18 µM, ou seja, uma baixa concentração de composto foi suficiente para inibir 50% dos parasitos. O teste de citotoxicidade em macrófagos murinos apresentou CC₅₀ em 1,53 µM o que é um valor baixo, porém quando comparado à EC₅₀ produz um Índice de Seletividade (CC₅₀/EC₅₀) no valor de 8,5. Então, apesar da alta efetividade do composto contra parasitos existe uma diferença de 1,35 µM entre a concentração efetiva e a concentração tóxica para as células.

Tabela 1 – Concentrações efetivas e citotóxicas em µM para 50% de culturas celulares obtidas após ensaio de MTT. Índice de Seletividade (CC₅₀/EC₅₀)

| Composto | <i>L. (V.) braziliensis</i> EC ₅₀ ± DP (µM) | Macrófagos CC ₅₀ ± DP (µM) | I.S. CC ₅₀ /EC ₅₀ |
|----------|---|--|--|
| DPPE 1.2 | 0,18 ± 0,07 | 1,53 ± 0,31 | 8,5 |

Os ensaios *in vitro* demonstraram inibição significativa (p<0.005) da taxa de infecção em 0,25 µM (**Figura 1A**), valor este, próximo ao descrito pela EC₅₀ (0,18 µM) (**Tabela 1**), no qual é baixa o suficiente para não atingir concentrações tóxicas para as células hospedeiras, além disso imagens obtidas por microscopia óptica (**Figura 2B**) revelam importante diminuição de macrófagos infectados em relação ao controle (**Figura 2A**). As

concentrações 0,125; 0,06 e 0,03 μM também levaram a resultados significativos em relação ao controle (**Figura 1A**). Porém, em relação a proporção de parasito a cada 100 macrófagos infectados (**Figura 1B**) não foi possível a obtenção de dados significativos, indicando que, apesar da diminuição de macrófagos infectados, a proporção de parasitos por macrófagos permanece inalterada. Quanto ao índice de infectividade (**Figura 1C**), a maior concentração de composto mostrou-se significativamente efetiva ($p < 0.05$).

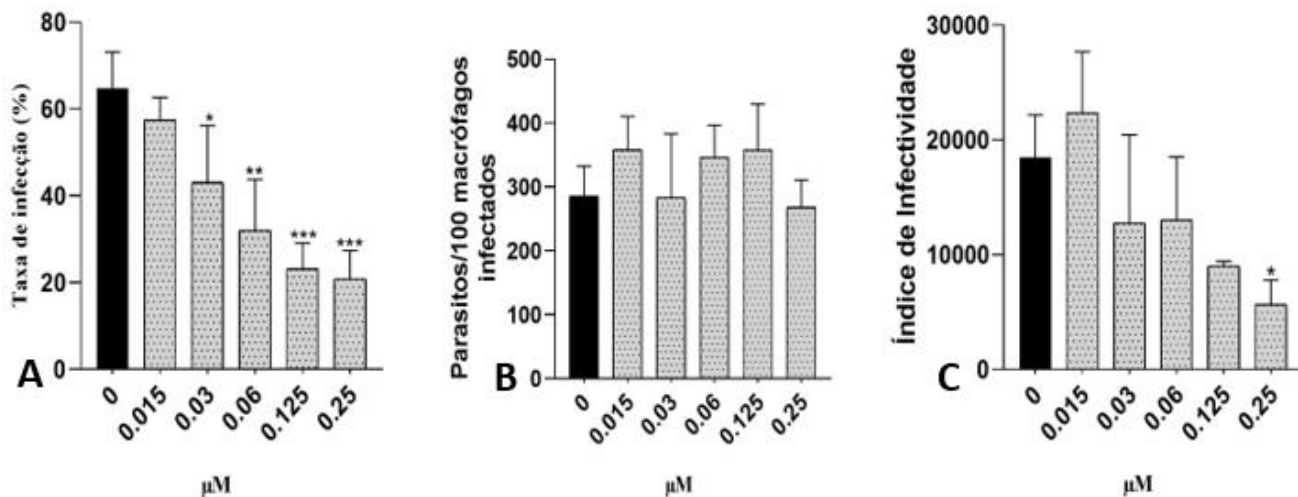


Figura 1 – Perfil das infecções *in vitro* na presença do DPPE 1.2. Macrófagos primários de camundongos Balb/C foram infectados com *L. (V.) brasiliensis* (MOI = 10) e incubados por 24 h com o metalocomposto. Após esse tempo, as infecções foram contadas quanto ao número de amastigotas e células infectadas para obtenção dos gráficos (1A) taxa de infecção, (1B) parasitos a cada 100 macrófagos e (1C) índice de infectividade. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste ANOVA, utilizando os dados das infecções tratadas vs. Infecções não tratadas. * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p > 0.0006$.

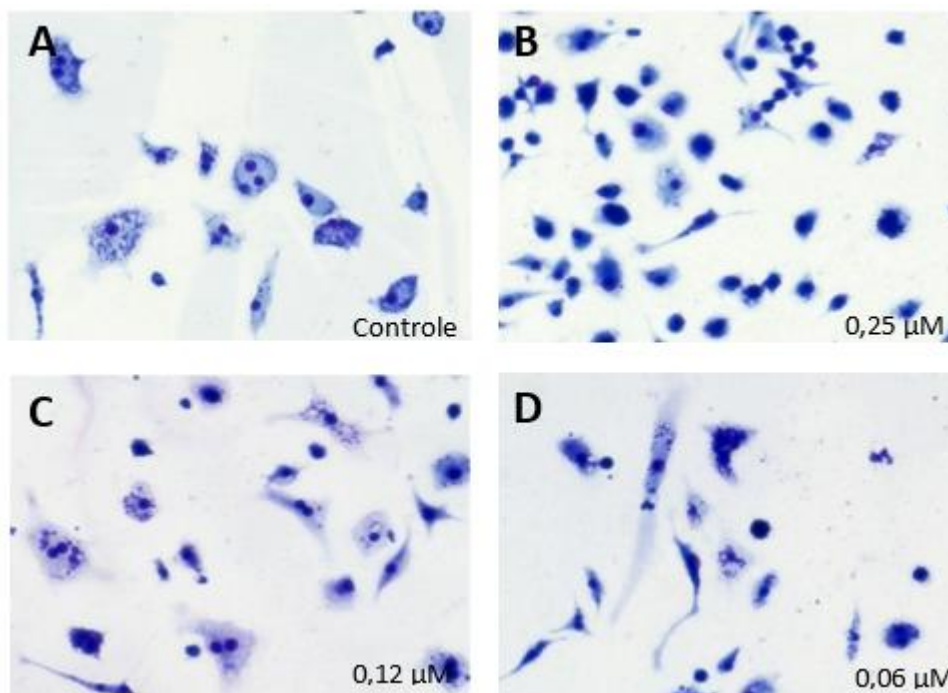


Figura 2 Infecções *in vitro* de macrófagos murinos com promastigotas de *L. (V.) brasiliensis* tratados com DPPE 1.2. Fotografias obtidas a partir de microscopia óptica após infecção de macrófagos oriundos de camundongos Balb/C com promastigotas de *L. (V.) brasiliensis* (MOI = 10) tratados com DPPE 1.2. em diferentes concentrações e não tratado (2A)

controle; **(2B)** 0,25; **(2C)** 0,12 e **(2D)** 0,06 μM . (Essas infecções foram tratadas por 24 h e coradas com kit panóptico rápido (NewProv, Pinhais).

CONCLUSÕES:

O composto apresentou eficácia contra *L. (V.) braziliensis* com um bom índice de seletividade, no entanto, a concentração do candidato deve ser minuciosamente controlada, visto que, concentrações mais altas podem ser tóxicas para células hospedeiras. A diminuição da taxa de infecção em experimentos *in vitro* apresentaram bons resultados e estudos prospectivos são necessários para avaliar a eficácia do candidato em modelos *in vivo* bem como seu mecanismo de ação.

BIBLIOGRAFIA

1. AKHOUNDI, M. et al. Correction: a historical overview of the classification, evolution, and dispersion of leishmania parasites and sandflies. *Plos Neglected Tropical Diseases*, [S.L.], v. 10, n. 6, p. 1, 2 jun. 2016.
2. SUNTER, J. & GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open biology*, v. 7, n. 9, p. 170165, 2017.
3. Leishmaniose. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS/OMS) Janeiro 2022
4. ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: a general review. *Revista da Associação Médica Brasileira*, v. 64, p. 281-289, 2018.
5. Marzochi, M. C. A., Marzochi, K. B. F., Oliveira Schubach, A. F. A., Miranda, L. F. C., & Pacheco, R. S. (2021). Anthropogenic Dispersal of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the Americas: A Plausible Hypothesis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 54, e20210401. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0401-2021>.
6. ALCÂNTARA, M. et al. Challenges in drug discovery targeting TriTryp diseases with an emphasis on leishmaniasis. *IJP: Drugs and Drug Resistance*. 430–439. 2018.
7. LIMA, EB. et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, [S.L.], v. 82, n. 2, p. 111-124, abr. 2007.
8. PALADI, CS. et al. In vitro and in vivo activity of a Palladacycle Complex on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Plos Neglected Tropical Diseases*, [S.L.], v. 6, n. 5, p. 1, 15 maio 2012. Public Library of Science (PLOS).
9. SACKS, D; KAMHAWI, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. *Annual Review Of Microbiology*, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 453-483, out. 2001. Annual Reviews.
10. 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, 2020.