

2.13.01 - Parasitologia / Protozoologia de Parasitos

AVALIAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO (ZnO) DOPADAS COM PRATA (Ag)

Rhanoica Oliveira Guerra^{1*}, Rafaela Miranda Barbosa¹, Marcela Rezende Lemes¹, Carlo José Freire de Oliveira¹, Virmondos Rodrigues Junior¹, Anielle Christine Almeida Silva², Marcos Vinícius da Silva³

1. Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM)

2. Universidade Federal de Alagoas (UFAL)

3. Orientador e professor-pesquisador da UFTM - Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia

Resumo

Leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. As drogas anti-leishmania atuais apresentam baixa efetividade e algumas limitações, como toxicidade, alto custo e doses efetivas elevadas. Neste estudo, foi avaliado o potencial leishmanicida das nanopartículas (NPs) de Óxido de Zinco (ZnO) puras e dopadas com 5%, 9% e 11% de prata (Ag).

A porcentagem de viabilidade das promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum*, bem como a toxicidade em células VERO após tratamento com diferentes concentrações das NPs foram analisadas através do uso de Resazurina.

Nossos resultados apontam efeito leishmanicida das NPs em promastigotas de *L. braziliensis* e *L. infantum*, comparado-se com o controle negativo. Ademais, as nanoformulações mostraram características biocompatíveis, já que não foram tóxicas em células VERO. Portanto, as NPs de ZnO podem ser consideradas uma alternativa promissora para o tratamento de leishmanioses.

Palavras-chave: leishmanioses; toxicidade in vitro; biocompatibilidade

Apoio financeiro: UFTM

Trabalho selecionado para a JNIC: UFTM

Introdução

As Leishmanioses são um grupo de doenças infecto-parasitárias, tropicais e negligenciadas causadas por mais de 20 espécies de parasitos do gênero *Leishmania* (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). A transmissão das leishmanioses ocorre através do repasto sanguíneo de um flebotomíneo fêmea pertencente ao gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo ou *Phlebotomus* no Velho Mundo, que inocula formas flageladas infectantes das leishmanias, as promastigotas metacíclicas, na pele do hospedeiro vertebrado. Estas são rapidamente fagocitadas pelas células fagocíticas, como neutrófilos e macrófagos, se diferenciam em formas não flageladas (amastigotas) e multiplicam-se. O ciclo se fecha, quando o inseto não infectado ingere amastigotas internalizadas nos macrófagos do indivíduo, as quais irão se diferenciar novamente em promastigotas no intestino do vetor. (ANVERSA et al., 2018; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018)

Hoje, no Brasil, a droga de primeira escolha preconizada pelo Ministério da Saúde (MS) é o Antimoniato de Meglumina (AM, Glucantime®), um antimonial pentavalente que altera a bioenergética do parasito (ANVERSA et al., 2018). Porém, essa droga apresenta algumas limitações, por exemplo, doses efetivas altas, chances de o paciente adquirir resistência, tempo longo de tratamento, toxicidade e efeitos adversos (BRASIL, 2006, 2017). Por isso, é necessário o desenvolvimento de estratégias terapêuticas novas ou adjuvantes às atuais, que sejam seguras e eficazes para o combate ou controle das leishmanioses.

Uma alternativa terapêutica para leishmanioses é o uso de nanopartículas de Óxido de Zinco (ZnO), visto que possuem propriedades antimicrobianas, além de serem química e fisicamente estáveis (DELAVARI et al., 2014; FONSECA et al., 2019). Sua atividade catalítica induz a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), as quais são tóxicas aos parasitos (JEBALI; KAZEMI, 2013; NAZIR et al., 2019). Entre as estratégias de potencializar os efeitos das nanopartículas de ZnO, a dopagem com íons de prata (Ag⁺) é promissora, pois este metal apresenta alta atividade contra microrganismos (FONSECA et al., 2019).

Assim, objetivamos avaliar o efeito nanopartículas de ZnO puras e dopadas com 5%, 9% e 11% de Ag em formas promastigotas de *L. infantum*, *L. braziliensis* e em células VERO.

Metodologia

Nanopartículas: a síntese das nanopartículas de ZnO puras e dopadas com Ag foi realizada no Laboratório de Nanotecnologia do Instituto de Física da Universidade Federal de Alagoas (UFAL).

Cultura de promastigotas e teste de toxicidade: as espécies *L. braziliensis* e *L. infantum* foram mantidas separadamente em garrafas de cultura em meio de Schneider suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) em estufa com temperatura entre 26 – 28°C. Foram adicionadas 1×10^7 leishmanias na fase estacionária de crescimento por poço em microplacas, depois tratadas com as nanopartículas (ZnO pura; ZnO:5Ag, ZnO:9Ag e ZnO:11Ag). A viabilidade foi avaliada após 24 horas com a adição de Resazurina (Sigma,

EUA), incubação por duas horas a 37°C, 5% CO₂ e posterior leitura quanto à emissão de fluorescência em leitor de microplacas EnSpire (Perkin-Elmer – USA), com excitação em 560 nm e emissão em 590 nm.

Cultura de células VERO e teste de biocompatibilidade: as células VERO foram mantidas em garrafas de cultura com meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB (RPMI 10%) em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Foram colocadas 5x10⁴ células por poço em microplacas e incubadas por 24h em meio RPMI 10% para fixarem nas placas. Depois deste período, as células foram então tratadas com as diferentes nanoformulações e respectivos controles, e avaliadas após 24 horas quanto à viabilidade celular. Para isso, foi adicionado Resazurina (Sigma, EUA), incubação por duas horas a 37°C, 5% CO₂ e posterior leitura quanto à emissão de fluorescência em leitor de microplacas EnSpire (Perkin-Elmer – USA), com excitação em 560 nm e emissão em 590 nm.

Análises estatísticas: foram realizadas com o auxílio do GRAPHPAD PRISM 5.0 (GRAPHPAD SOFTWARE – EUA).

Resultados e Discussão

Todas as nanoformulações provocaram a diminuição na viabilidade de promastigotas de *L. braziliensis* (Fig. 1) e *L. infantum* (Fig. 2), comparadas ao não tratamento. Os gráficos de DMSO (Figs. 1 e 2E), o qual é o diluente das nanopartículas, demonstraram que o efeito anti-leishmania era realmente pelo uso das nanopartículas. Observou-se, também, que as nanopartículas de ZnO puras em *Leishmania braziliensis* (Fig. 1 A) tiveram, sobretudo, ações leishmanicidas em doses menores, enquanto que as nanopartículas dopadas sobressaíram em doses maiores.

Figura 1 - Avaliação da toxicidade em promastigotas de *Leishmania braziliensis*

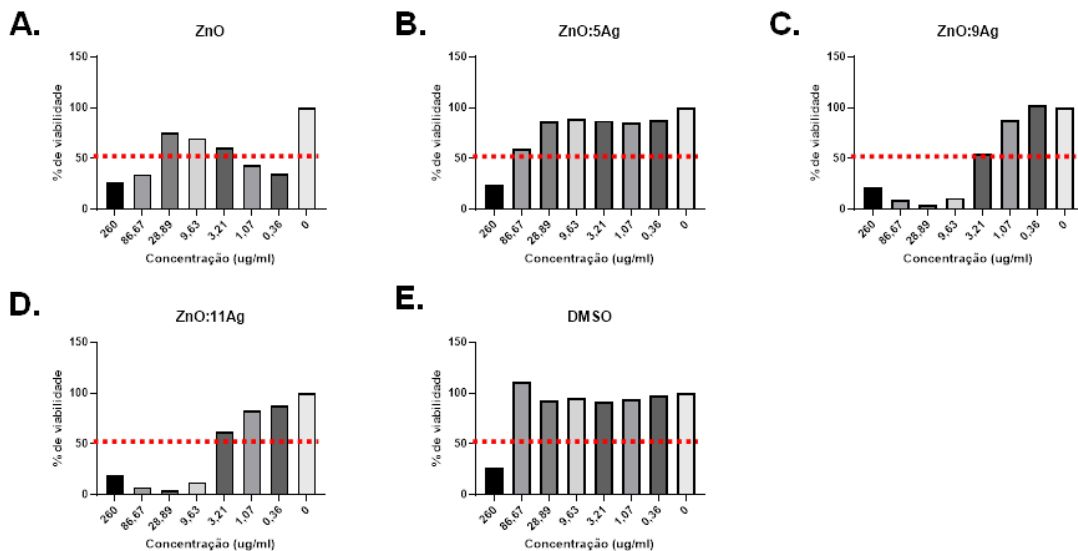
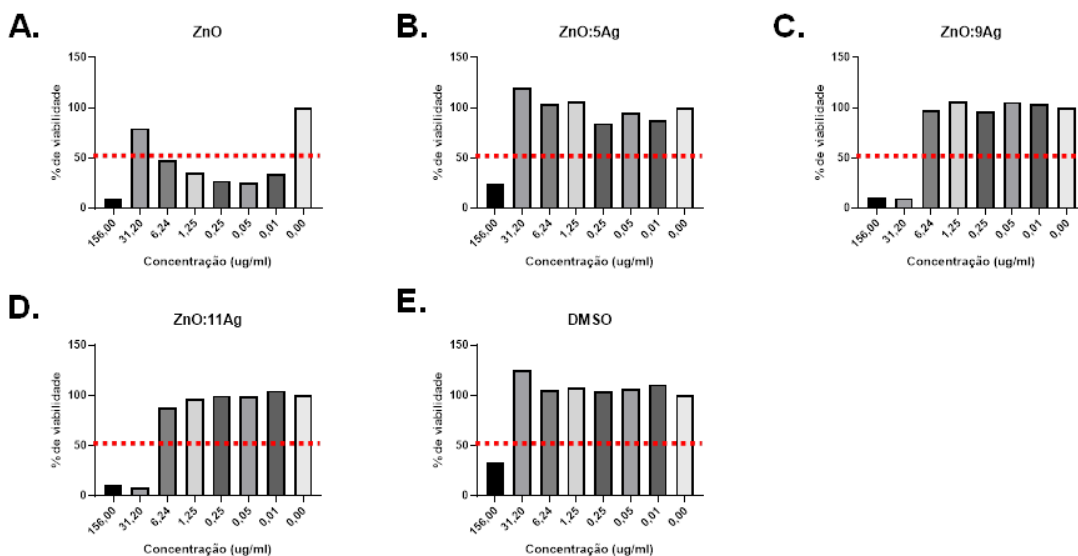


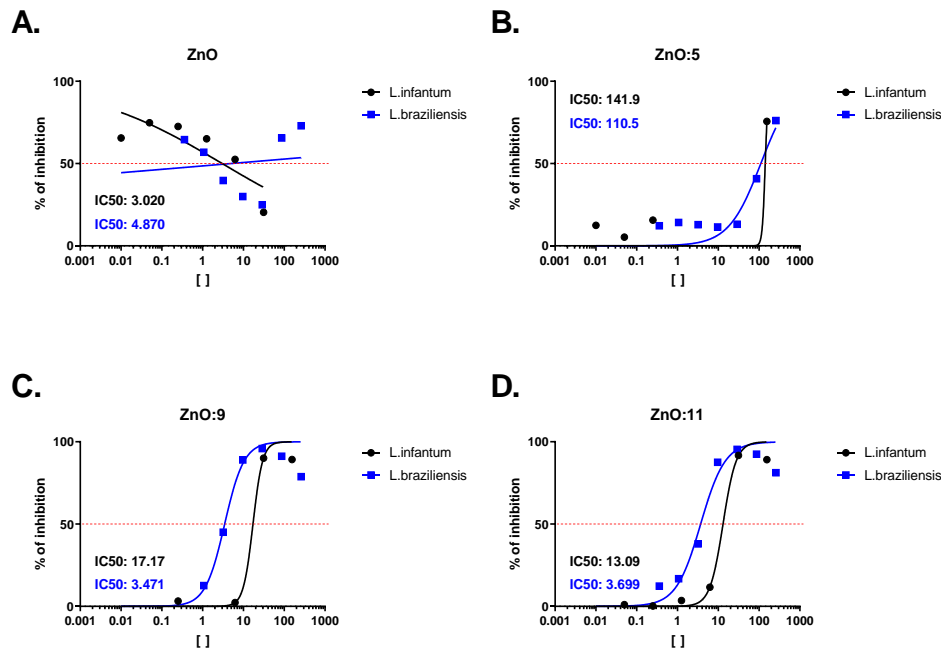
Figura 2 - Avaliação da toxicidade em promastigotas de *Leishmania major*



Ao analisar as curvas de regressão não linear para determinar a concentração inibitória de 50% (IC₅₀), notou-se que dentre as NPs dopadas, a que apresentou maior eficácia em promastigotas de *L. braziliensis* foi a NP com 9% de Ag⁺ (IC₅₀: 3,471 µg/mL) (Fig. 3C), enquanto que em *L. infantum* foi com 11% de Ag⁺ (IC₅₀: 13,09 µg/mL) (Fig. 3D). Além disso, sugere-se que as promastigotas *L. braziliensis* sejam mais sensíveis ao

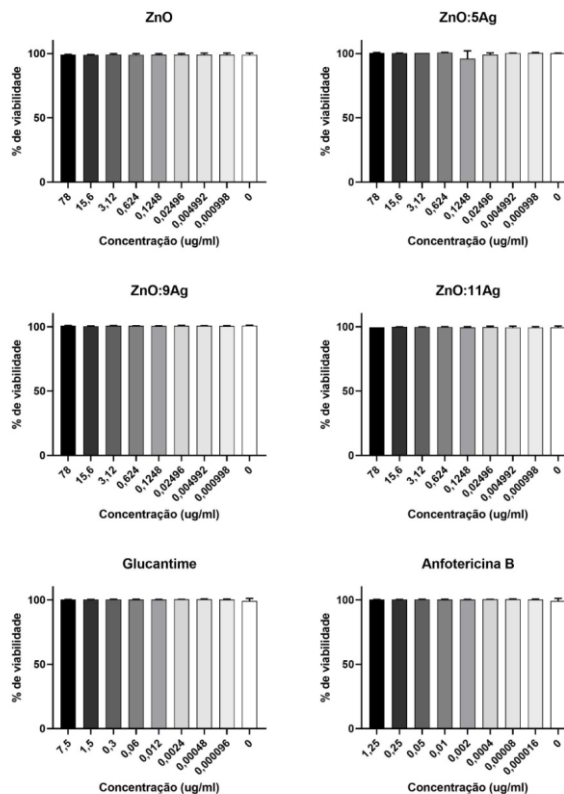
uso terapêutico das nanoformulações, inibindo 50% em dose menor, comparadas com as promastigotas de *L. infantum*.

Figura 3 - Curva de regressão não linear para determinar a concentração inibitória 50% (IC50)



A biocompatibilidade das nanopartículas foi investigada em células epiteliais renais de macaco verde africano (VERO), uma vez que são recomendadas pelo Órgão Internacional de Padronização (*International Standard Organization* – ISO). Estes testes (Fig. 4) mostraram que os compostos em diferentes concentrações não tiveram ações lesivas nas células, bem como o uso de Glucantime e Anfotericina B, que são as principais drogas leishmanicidas usadas atualmente. Assim, estes resultados indicam que as NPs podem ser seguras e compatíveis às células humanas.

Figura 4 – Biocompatibilidade em células VERO tratadas com nanopartículas



Até onde sabemos, com base em uma pesquisa na literatura, não existem estudos que relatam o efeito de nanopartículas de ZnO puras e dopadas com Ag^+ em *L. infantum* e *L. braziliensis*. Porém, outros estudos mostraram as propriedades anti-leishmania de nanopartículas ZnO de síntese química e/ou biogênica em *L.*

tropica e *L. major*, com diminuição na viabilidade de promastigotas e amastigotas, além da redução da infectividade, em diferentes condições (DELAVARI et al., 2014; JEBALI; KAZEMI, 2013; ABBASI et al., 2019; SUMAIRA et al., 2018).

Embora não muito esclarecidos, os mecanismos de ação das ZnO NPs envolvem a destruição da integridade celular através do contato direto das nanopartículas e a membrana celular, liberação de íons de Zn^{2+} e, principalmente, formação de EROs (SHAIKH et al., 2019). Desta forma, as nanopartículas podem superar a atividade antioxidante das espécies de *Leishmania* e as formas de escape do parasito que favorecem a patogênese das leishmanioses, como o bloqueio da produção de EROs pelos macrófagos (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015; ROSSI; FASEL, 2018).

Além de serem consideradas como segura e não tóxica pelo Food and Drug Administration U.S.A. (FDA), as nanopartículas de ZnO são constituídas por um micronutriente essencial ao organismo humano, o zinco, o qual tem papéis cruciais na resposta imunológica, homeostase e cicatrização de lesões cutâneas (CHASAPIS et al., 2020; FONSECA et al., 2019). Dessa forma, visto que pacientes com leishmanioses apresentam redução deste elemento químico (FARZIN; MOASSESI, 2014), o uso das ZnO NPs poderia melhorar o prognóstico desses indivíduos.

Conclusões

No geral, nossas descobertas sugerem que as NPs de ZnO puras e dopadas com íons de Ag^+ possuem atividade leishmanicida *in vitro*. Logo, por mais que novos estudos sejam necessários, incluindo testes *in vivo* com uso de NPs de ZnO, estas podem ser consideradas uma alternativa promissora para o tratamento de leishmanioses.

Referências bibliográficas

- ABBASI, B. A. et al. Bioactivities of Geranium wallichianum Leaf Extracts Conjugated with Zinc Oxide Nanoparticles. **Biomolecules**, v. 10, n. 1, 26 dez. 2019.
- ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Rev Assoc Med Bras (1992)**, v. 64, n. 3, p. 281–289, mar. 2018.
- BRASIL, O. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=document&layout=default&alias=1462-manual-vigilancia-e-controle-da-leishmaniose-visceral-2&category_slug=leishmanioses-978&Itemid=965>. Acesso em: 19 mar. 2021.
- BRASIL, O. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_docman&view=document&layout=default&alias=1463-manual-vigilancia-da-leishmaniose-tegumentar-americana-3&category_slug=leishmanioses-978&Itemid=965>. Acesso em: 19 mar. 2021.
- BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. **Leishmaniasis** *The Lancet*, 2018.
- CHASAPIS, C. T. et al. Recent aspects of the effects of zinc on human health. **Archives of Toxicology**, v. 94, n. 5, p. 1443–1460, 1 maio 2020.
- DELAVARI, M. et al. In Vitro Study on Cytotoxic Effects of ZnO Nanoparticles on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania major* (MRHO/IR/75/ER). **Iranian Journal of Parasitology**, v. 9, n. 1, p. 6–13, mar. 2014.
- FARZIN, L.; MOASSESI, M. E. A comparison of serum selenium, zinc and copper level in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences**, v. 19, n. 4, p. 355–357, abr. 2014.
- FONSECA, B. B. et al. Nanocomposite of Ag-Doped ZnO and AgO Nanocrystals as a Preventive Measure to Control Biofilm Formation in Eggshell and Salmonella spp. Entry Into Eggs. **Front Microbiol**, v. 10, p. 217, 2019.
- JEBALI, A.; KAZEMI, B. Nano-based antileishmanial agents: a toxicological study on nanoparticles for future treatment of cutaneous leishmaniasis. **Toxicol In Vitro**, v. 27, n. 6, p. 1896–904, set. 2013.
- NAZIR, S. et al. Antileishmanial activity and cytotoxicity of ZnO-based nano-formulations. **Int J Nanomedicine**, v. 14, p./ 7809–7822, 2019.
- PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. **Future Microbiology**, v. 10, n. 1, p. 111–129, 2015.
- ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **Int Immunol**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 10 mar. 2018.
- SHAIKH, S. et al. Mechanistic Insights into the Antimicrobial Actions of Metallic Nanoparticles and Their Implications for Multidrug Resistance. **Int J Mol Sci**, v. 20, n. 10, 18 maio 2019.