

2.13.99 - Parasitologia

EFICÁCIA TERAPÊUTICA DE UMA NAFTOQUINONA INCORPORADA EM MICELAS POLIMÉRICAS COMO DELIVERY APLICADA CONTRA A LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Raquel Soares Bandeira¹; Débora V.C. Mendonça²; Grasielle S.V. Tavares²; Daniela P. Lage²; Vívian T. Martins²; Luciana M.R. Antinarelli³; Isabela A.G. Pereira²; Fernanda F. Ramos²; João A. Oliveira-da-Silva²; Amanda S. Machado²; Alessandra M. Silva²; Danniele L. Vale²; Fernanda Ludolf²; Miguel A. Chávez-Fumagalli⁴; Bruno M. Roatt⁵; Elaine S. Coimbra³; Ricardo J. Alves⁶; Eduardo A.F. Coelho^{1,2}

¹ Setor de Patologia Clínica, COLTEC, Universidade Federal de Minas Gerais.

² Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Infectologia e Medicina Tropical, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

³ Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

⁴ Universidad Católica de Santa María, Urb. San José S/N, Umacollo, Arequipa, Perú.

⁵ Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil.

⁶ Departamento de Produtos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Resumo

Os fármacos atualmente utilizados no tratamento da leishmaniose tegumentar (LT) apresentam toxicidade elevada. Assim, a melhoria das condições de tratamento da doença se faz necessária. O objetivo do projeto foi avaliar a atividade antileishmanial *in vivo* de micelas poliméricas (Poloxâmero 407) contendo uma molécula derivada da naftoquinona, Flau-A, contra *Leishmania amazonensis*, causadora da LT. Como objetivos específicos, o projeto avaliou a eficácia dessa formulação por meio da avaliação da resposta celular e humoral, carga parasitária após o tratamento e toxicidade renal e hepática.

Autorização legal: O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEUA) da UFMG com o número de protocolo 85/2017.

Palavras-chave: Leishmanioses, tratamento, Flau-A, sistema de delivery, toxicidade.

Apoio financeiro: CNPq, CAPES e UFMG.

Trabalho selecionado para a JNIC: UFMG.

Introdução

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas por flebotomíneos. A Leishmaniose Tegumentar se manifesta com úlceras cutâneas indolores capazes de ser porta de entrada para infecções secundárias, podendo apresentar também manifestações sistêmicas, como febre, mal-estar geral, emagrecimento entre outros sinais e sintomas (BRASIL, 2017). Dados indicam que há incidência das leishmanioses em 98 países no mundo, com a ocorrência de 1.0 a 1.5 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar (LT) (ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2019; AMEEN, 2010; MISHRA *et al.*, 2011). Embora apresente elevada incidência, as leishmanioses são doenças negligenciadas, sendo que poucos avanços foram obtidos em relação à melhoria do tratamento da doença. Os antimoniais pentavalentes são os principais fármacos utilizados no

tratamento da doença (GOTO; LINDOSO, 2010). A anfotericina B (AmB) é considerada um fármaco de segunda linha altamente ativo contra a *Leishmania*, especialmente quando há falha terapêutica com os fármacos antimoniais (YARDLEY; CROFT, 1997). Entretanto, apesar da existência do tratamento, os medicamentos citados podem causar graves efeitos adversos, como toxicidade renal, hepática e cardíaca (MURRAY et al., 2005). Portanto, com vistas à melhoria no índice terapêutico e à redução da citotoxicidade de fármacos no tratamento das LT, o desenvolvimento de novos medicamentos eficazes e seguros se faz necessário. A Flau-A demonstrou em *in vitro* uma eficiente atividade leishmanicida, bem como baixa toxicidade em macrófagos murinos e eritrócitos humanos (MENDONÇA *et al*, 2018). Desse modo, o presente projeto teve como foco desenvolver uma nova formulação farmacêutica composta por sistemas de micelas poliméricas (Poloxamero 407) capazes de incorporar a Flau-A, denominada Flau/M, de modo a permitir uma liberação mais lenta do fármaco, preservando sua eficácia e causando menos efeitos tóxicos aos camundongos. Pretende-se desenvolver um novo produto que futuramente seja capaz de ser avaliado em pacientes humanos para a melhoria das condições atuais de tratamento da leishmaniose tegumentar, a qual também apresente alta eficácia terapêutica e baixo custo para a população acometida pela doença.

Metodologia

In vivo: Utilizou-se 60 (n=10 por grupo) camundongos BALB/c fêmeas com 8 semanas de idade. **Parasitas e antígenos:** *L. amazonensis* foram cultivadas a 24°C em meio de Schneider com 20% de soro fetal bovino inativado, L-glutamina 20mM, penicilina 200U/mL, estreptomicina 100ug/mL pH7,4. O extrato solúvel de *Leishmania* (SLA) foi preparado a partir de 10¹⁰ promastigotas estacionárias. **Infecção e tratamento:** Os camundongos foram infectados por via subcutânea com 10⁷ promastigotas estacionárias e, 50 dias após, foram tratados 15 dias por injeção a cada dois dias como descrito: a) Grupo salino (controle): os animais receberam 50µL de PBS 1x por via subcutânea; b) Grupo micelas vazias (M): recebeu 50µL de micelas não incorporadas (1mg/kg); c) grupo Anfotericina B (AmB): recebeu 50µL de AmB (1 mg/kg) via intraperitoneal; d) Grupo Ambisome®: recebeu 50µL de produto (2mg/kg) por via intravenosa, a cada cinco dias; e) grupo Flau-A: recebeu 50 µL de Flau-A (10mg/kg) via subcutânea; f) Grupo Flau-A /micela (Flau-A/M): recebeu 50 µL de micelas contendo Flau-A (5mg/kg) via subcutânea. O diâmetro médio da lesão foi mensurado semanalmente com paquímetro eletrônico e, 30 dias após o tratamento, os animais foram sacrificados para avaliação. **Estudo toxicológico:** Para avaliar a toxicidade do tratamento, a nefrotoxicidade foi investigada pela dosagem de nitrogênio da uréia e creatinina, enquanto a função hepática foi analisada pela dosagem de alanina transaminase (ALT) e aspartato transaminase (AST) nas amostras de soro dos camundongos tratados. **Carga parasitária:** A avaliação foi realizada 30 dias após o tratamento por diluição limitante do baço, fígado, linfonodo drenante (dLN) e tecido infectado. Os órgãos foram pesados macerados em meio Schneider e os produtos foram serialmente diluídos em placas de 96 wells. Incubou-se por 7 dias a 24°C e lido em espectrofotômetro. A carga parasitária também foi avaliada no tecido infectado por uma técnica de qPCR. **Resposta imune:** Culturas de esplenócitos foram realizadas 30 dias após o término do tratamento. As células foram cultivadas em placas de 24 poços em meio DMEM e não estimuladas (controle) ou estimuladas com SLA a 37°C em 5% de CO₂ por 48h. As citocinas IFN-γ, IL-12, GM-CSF, IL-4 e IL-10 foram quantificadas pelo método ELISA de captura nos sobrenadantes e citometria de fluxo. A produção de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos foi quantificada por um espectrofotômetro a partir de amostras de soro coletadas dos animais 30 dias após o tratamento. Para isso, o SLA foi usado como antígeno (1,0 µg/well) nas amostras diluídas para posterior adição de anticorpos anti-IgG1 ou IgG2a. **Estatística:** os resultados

foram analisados pelo teste de variância unidirecional e pós-teste de Turkey para a comparação entre os grupos. Os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

Resultados e Discussão

A eficácia terapêutica *in vivo* empregando AmB, Ambisome®, Flau-A ou Flau-A/M foi avaliada em camundongos BALB/c contra infecção por *L. amazonensis*. Para isso, foram investigados o diâmetro médio da lesão e a carga parasitária no tecido infectado, fígado, baço e linfonodo de drenagem dos animais, 30 dias após o tratamento. Os grupos de camundongos tratados com AmB, Ambisome®, Flau-A e Flau-A/M apresentaram reduções significativas no parasitismo tecidual e orgânico, quando comparados aos controles, sendo as reduções mais significativas também encontrado nos grupos Flau-A e Flau-A/M, havendo também diminuição da lesão. A qPCR do tecido infectado confirmou também que os grupos Flau-A e Flau-A/M foram os que apresentaram as reduções mais significativas no parasitismo, quando comparados aos demais. O perfil das citocinas Th1 e Th2 foi avaliado no sobrenadante celular das culturas estimuladas por SLA, 30 dias após o tratamento. Os resultados mostraram que as células do baço coletadas nos grupos AmB, Ambisome®, Flau-A e Flau-A/M produziram níveis mais altos de IFN γ , destacando-se a Flau-A/M a qual produziu significativamente níveis mais altos de IFN- γ associados a baixos de níveis de IL-4 e IL-10, demonstrando um perfil de resposta Th1 potente, o qual caracteriza uma resposta antileishmanial. O teste de citometria de fluxo utilizado para investigar a frequência das células T produtoras de citocinas também corrobora com o perfil imunológico Th1. Para avaliar a ativação específica de macrófagos nos animais tratados e infectados, a produção de nitrito, IL-12 e GM-CSF foi investigada no sobrenadante celular, mostrando níveis mais altos desses marcadores nos grupos AmB, Ambisome®, Flau-A e Flau-A/M, embora maior produção tenha sido observada nos grupos Flau-A e Flau-A/M. A redução efetiva da IL-10, associada à regulação positiva de IFN- γ e IL-12, atua como um fator chave para terapêuticas com sucesso, uma vez que apresenta o perfil Th1 (BHATTACHARYA *et al.*, 2015; BOGDAN, 2012). Com relação à resposta humoral, os camundongos tratados com Flau-A e Flau-A/M também apresentaram predominância de IgG2a antileishmanial, quando comparados aos níveis de IgG1. Compreende-se que o curso da infecção por *L. amazonensis* é modulado pela resposta dos linfócitos T e da rede de citocinas. O IFN- γ secretado pelas células Th1 promove a diferenciação de Th1 e inibe a proliferação das células Th2, com posterior ativação de linfócitos B e produção de IgG2a (BARBIERI, 2006; FREITA; PINHEIRO, 2013). De outro modo, a IL-4 produzida pelas células Th2 promove a diferenciação das próprias células Th2 e, juntamente com IL-10, inibe a ativação das células Th1, aumentando a produção de IgG1 (BELKAID *et al.*, 2002). Logo, a maior produção de IgG2a e a diminuição de IgG1 corroboram com o perfil de resposta antileishmanial. Quanto à toxicidade, os resultados mostraram aumento significativo das enzimas séricas associadas a danos renais e hepáticos em camundongos tratados com AmB. Os resultados mostraram redução significativa da toxicidade em camundongos tratados com a Flau-A/M, quando comparados aos valores obtidos nos demais grupos, além de apresentar níveis séricos de enzimas semelhantes aos camundongos *naïve*.

Conclusão

O presente trabalho pode ser considerado relevante, uma vez que as micelas contendo Flau-A mostraram uma ação antileishmanial eficaz *in vivo* associada à baixa toxicidade no modelo murino, quando comparado aos outros medicamentos utilizados no tratamento proporcionando a redução da carga parasitária nos animais tratados. Vale enfatizar também a sua capacidade de potencializar a resposta imunológica dos

animais infectados. Ademais, devido também à sua estabilidade e facilidade de produção, o Flau-A/M pode ser considerado em estudos futuros como um agente antileishmanial contra Leishmaniose Tegumentar Humana.

Referências

- ALVAR J. et al. THE WHO LEISHMANIASIS CONTROL TEAM. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PloS One**. V. 7(5), 2012.
- AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin Exp Dermatol**, v. 35, p. 699-705, 2010.
- BARBIÉRI C. L. Immunology of canine leishmaniasis. **Parasite Immunol**. 28: 329–337. 2006.
- BELKAID, Y., PICCIRILLO, C. A., MENDEZ, S., SHEVACH, E.M.; SACKS D.L. CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. **Nature**. 420: 502– 507, 2002.
- BHATTACHARYA, P.; DEY R. , DAGUR P.K. et al. Genetically modified live attenuated Leishmania donovani parasites induce innate immunity through classical activation of macrophages that direct the Th1 response in mice. **Infectar. Immun.** v. 83, pp. 3800 – 3815, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**, 2017. 189 p.
- BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, 2, p. 69, 2012.
- FREITAS, J.C.C.; PINHEIRO, D.C.S.N. Leishmaniasis: an approach about the immunoglobulins and cytokines involved in infection and vaccination. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.7, n.3, p.193-204, 2013.
- GOTO, H; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**. v. 8, p.419-433, 2010.
- MENDONÇA, D.V.C. et al. Atividade antileishmania de um derivado da naftoquinona contra estágios promastigota e amastigota de Leishmania infantum e Leishmania amazonensis e seu mecanismo de ação contra espécies de L. Amazonensis. **Parasitol. Res.**, v.117 , pp. 391 - 403, 2018.
- MISHRA, B.B., TIWARI, V.K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **Eur J Med Chem**, v. 46, n. 10, p. 4769-807, 2011.
- MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAIVA, N. G. Advances in Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, p. 1561-1577, 2005.
- YARDLEY, V.; CROFT, S.L. Activity of Liposomal Amphotericin B against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 41, p. 752-756, 1997.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Leishmaniasis**, 2019. <http://www.who.int/topics/leishmaniasis/en/>.