AVALIAÇÃO DO EFEITO LEISHMANICIDA *IN VITRO* DE DIAMINAS TERPÊNICAS

Kevin William Richter (BIC/Fundação Araucária/UEPG), Iriane Eger (Orientador), e-mail: iriane.eger@gmail.com.
Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento de Biologia Geral.

Área Parasitologia e subárea do conhecimento Protozoologia.

Palavras-chave: *Leishmania chagasi*, bioatividade, diaminas, DBR10.

Resumo

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias endêmicas em 88 países, afetam aproximadamente 12 milhões de indivíduos. A doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas com comprometimento cutâneo, mucoso ou visceral, de acordo com a espécie de parasito ou resposta imune do paciente. O tratamento medicamentoso da leishmaniose se baseia em alguns fármacos disponíveis, os quais causam efeitos colaterais, levando ao abandono do tratamento e consequente falha terapêutica. Estudos prévios de bioatividade de diaminas mostraram uma promissora atividade antiparasitária *in vitro.* Neste contexto, o presente trabalho tem como objetivo avaliar o efeito leishmanicida *in vitro* de sete novos derivados de diaminas terpênicas. A citotoxicidade sobre células de mamífero foi avaliada frente às células Vero. Com exceção da DBR12, nenhuma das outras diaminas foram citotóxicas. A curva concentração resposta mostrou que apenas a DBR10 foi ativa contra formas promastigotas de *Leishmania chagasi* com o valor de CI_{50} de 34 µM, sendo pelo menos três vezes mais tóxica para *L. chagasi* do que para as células de mamífero da linhagem Vero. Esses resultados sugerem o potencial leishmanicida da diamina terpênica DBR10.

Introdução

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias endêmicas em 88 países, afetam aproximadamente 12 milhões de indivíduos, ocasionando anualmente cerca de 2 milhões de casos novos e 70 mil óbitos (WHO, 2010). A doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas com comprometimento cutâneo, mucoso ou visceral, de acordo com a espécie de parasito ou resposta imune do paciente.

O tratamento medicamentoso da leishmaniose causa efeitos colaterais, levando ao abandono do tratamento e consequente falha terapêutica. Diante disto, a OMS incentiva estudos que possam apontar novas alternativas para o tratamento desta e outras zoonoses.

As diaminas podem ser definidas como aminas com duas ou três cadeias alifáticas conectadas por átomos de nitrogênio e agem na via de biossíntese das poliaminas de diversos parasitos, interferindo em funções essenciais, tais como biossíntese de ácidos nucleicos e proteínas, proliferação e diferenciação celular.

Estudos prévios de bioatividade dessas diaminas mostraram uma promissora atividade antiparasitária *in vitro* contra formas tripomastigotas de *T. cruzi*, assim como contra promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*, causadores da leishmaniose tegumentar e visceral, respectivamente (DA COSTA et al, 2009; REZENDE-JUNIOR et al, 2010; VEIGA-SANTOS et al, 2015). Com base nesses

resultados, o Depto. de Química da Universidade Federal de Itajubá, parceiro no projeto financiado pelo CNPq (Edital MCTI/CNPq Nº 14/2014) sintetizou novos derivados de diaminas terpênicas com o intuito de potencializar o efeito tripanocida *in vitro* para posteriores estudos *in vivo*. Recentemente, nosso grupo avaliou a atividade contra *T. cruzi* dessas sete novas diaminas terpênicas, sendo que a DBR12 apresentou atividade tripanocida *in vitro* com o valor da CI_{50} de 58 µM e 9,9 µM para epimastigotas e amastigotas intracelulares, respectivamente. A DBR12 foi cerca de 4,5 vezes mais tóxica para amastigotas intracelulares do que para a célula de mamífero da linhagem Vero (IS= 4,4) (RICHTER e EGER, 2017). Neste contexto, para dar continuidade aos estudos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade *in vitro* desses sete derivados de diaminas terpênicas contra *Leishmania*.

Materiais e Métodos

Compostos

Sete diaminas terpênicas (TG01, TG02, DBR05, DBR08, DBR10, DBR12 e DBR14), fornecidas pelo Depto. de Química da Universidade Federal de Itajubá (MG), foram solubilizadas em DMSO a 50mM e estocadas a -4 o C até os uso.

Ensaios de citotoxicidade contra células Vero

Células Vero (ATCC CCL-81) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas a 37°C com diferentes concentrações (12,5 a 100 µM) dos compostos diluídos em DMEM por 48 horas. A integridade do tapete celular foi observada em microscópio invertido, seguida do ensaio colorimétrico do MTT.

Triagem de compostos com atividade leishmanicida

Formas promastigotas ($3x10^6$ parasitos/ml) de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi* foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas com diferentes concentrações (10 a 100µM) das diaminas. A atividade antiparasitária foi avaliada através de microscópio invertido.

Resultados e Discussão

Ensaios de citotoxicidade contra células Vero

Entre as sete diaminas avaliadas, com exceção da DBR12, nenhuma delas apresentou efeito citotóxico na concentração mais alta utilizada nos ensaios (Tabela 1). A diamina DBR12 apresentou valor de CC_{50} de 44 µM. Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* são testes de primeira escolha para avaliação de toxicidade, uma vez que são simples e rápidos, sendo considerados como dados iniciais de ausência ou presença de possíveis efeitos colaterais (LI et al., 2015).

Tabela 1. Avaliação do efeito citotóxico de diaminas terpênicas frente às células Vero

Diaminas	CC_{50} (µM) - Vero
TG01	>100
TG02	>100
DBR05	>100
DBR08	>100
DBR10	>100
DBR12	44,04 ± 0,75
DBR14	>100

Triagem de diaminas ativas contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*

A triagem revelou que a DBR 12 foi ativa contra *L. amazonensis* e a DBR10 contra *L. chagasi*, com taxas de inibição entre 50 a 70% a 10 µM (Tabela 2). Ao longo do trabalho, a cultura de *L. amazonensis* foi perdida e, portanto, a curva concentração-resposta foi realizada somente com *L. chagasi* frente a DBR10.

Tabela 2. Triagem inicial de diaminas ativas contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. chagasi*

	L. amazonensis		*L. chagasi*	
Compostos	100 µM	10 µM	100 µM	10 µM
TG01	s/a	s/a	s/a	s/a
TG02	s/a	s/a	s/a	s/a
DBR05	s/a	s/a	s/a	s/a
DBR08	s/a	s/a	s/a	s/a
DBR10	s/a	s/a	80%	50%
DBR12	100%	70%	s/a	s/a
DBR14	s/a	s/a	s/a	s/a

s/a: sem atividade
%: percentual de atividade leishmanicida

Curva concentração resposta de DBR10 contra formas promastigotas de *Leishmania chagasi*

A diamina DBR10 apresentou um percentual inibitório variando de 30 a 79% entre as concentrações de 15 a 100 µM, sendo o valor de CI_{50} estimado em 34 µM (Figura 1). A DBR10 não causou danos à célula de mamífero (Vero) em nenhuma das concentrações avaliadas, mostrando que efeito tóxico é específico contra *L. chagasi* (Índice de seletividade > 2,9).

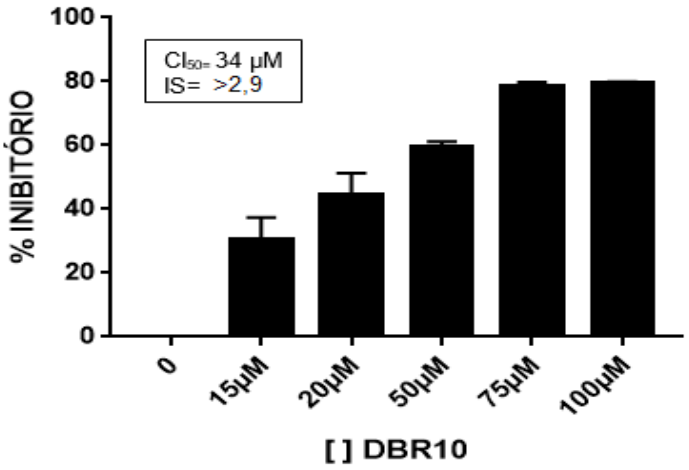


Figura 1. Curva concentração resposta de DBR10 contra formas promastigotas de *L. chagasi*.

Da Costa e colaboradores (2009) avaliaram o potencial anti-*L. chagasi* de uma série de 18 N-alkil diaminas lipofílicas e obtiveram taxas de CI_{50} variando de 0,26 a 83,6 µM, sendo que a N-dodecil 1,2-etanoldiamina foi cerca de 7 vezes mais

potente que o fármaco de referência anfotericina B (da Costa et al., 2009). Embora, as dimaninas avaliadas por Costa e colaboradores (2009) tenham sido mais potentes que as testadas no presente estudo, os autores não avaliaram a citotoxicidade. Em nosso trabalho, o efeito leihsmanicida ocorreu em um concentração que não causa efeito às células Vero, sugerindo que a DBR10 pode ter um efeito mais específico contra o parasito. A síntese de novos derivados a partir da DBR12 pode potencializar a atividade leihsmnicida sem causar citotoxicidade.

Conclusões

- Entre as sete diaminas terpênicas avaliadas, apenas a DBR10 apresentou atividade leishmanicida *in vitro, contra Leishmania chagasi*;

- O valor da CI_{50} de DBR10 contra *L. chagasi* foi de 34 µM e Índice de Seletividade de > 2,9;

- A DBR10 pode servir como protótipo para a síntese de molécular mais potentes contra *Leishmania chagasi.*

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a À Fundação Araucária/SETI e à UEPG pela concessão da bolsa do Programa BIC e ao suporte financeiro do CNPq (Edital MCTI/CNPq No 14/2014).

Referências

DA COSTA, C.F.; COIMBRA, E.S.; BRAGA, F.G.; REIS, R.C.N.; DA SILVA, A.D; DE ALMEIDA, M.V. Preparation and antileishmanial activity of lipophilic N-alkyl diamines. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 63, p. 40-42, 2009.

DAFFARA C.M., BARBOSA A., SOUZA T.C.A., BARBOSA G., SARAIVA M.F., ALMEIDA. HASNE, M.P.; COPPENS, I.; SOYSA, R.; ULLMAN, B.A highaffinity putrescine-cadaverine transporter from Trypanosoma cruzi.Mol Microbiol., v. 76, n. 1, p. 78–91, 2010.

LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices (Review). Biomedical Reports, v. 3 p. 617-620, 2015.

REZENDE-JUNIOR, C.O.; ALVES, R.O.; REZENDE, C.A.M.; DA COSTA, C.F.; SILVA, H.; HYARIC, M.L.; FONTES, A.P.S.; ALVES, R.J.; ROMANHA, A.J.; DE ALMEIDA, M.V. Trypanocidal activity of lipophilic diamines and amino alcohols. Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 64, p. 624-626, 2010.

RICHTER, K. W.; EGER, I. Avaliação do efeito tripanocida *in vitro* de diaminas terpênicas. EAIC XXVI, p. 4, 2017.

VEIGA-SANTOS P., LI K., LAMEIRA L., CARVALHO T.M.U, HUANG G., GALIZZI M., SHANG N., LI Q., GONZALEZ-PACANOWSKA D., HERNANDEZ-RODRIGUEZ V., BENAIM G., GUO R.T., URBINA J.A., DOCAMPO R., DE SOUZA W., OLDFIELD E. SQ109, a New Drug Lead for Chagas Disease. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 59(4): 1950-1961, 2015.

WHO: **WORLD HEALTH ORGANIZATION,** 2010. Control of the Leishmaniasis. Second report of the WHO Expert Committee. Geneva: WHO, 186p.

YAMANAKA C.N., GIORDANI R.B., REZENDE JR C.O., EGER I., KESSLER, R.L., TONINI M.L., MORAES M.H., ARAÚJO D.P., ZUANAZZI J.A., ALMEIDA M.V., STEINDEL M. Assessment of Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Aliphatic Diamine Derivatives. Chem Biol Drug Des *doi: 10.1111/cbdd.12191*, p.1-8, 2013.