

AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS E DESENVOLVIMENTO DE UMA *Leishmania braziliensis* FLUORESCENTE PARA

AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS SINTÉTICOS DERIVADOS DE CARVACROL E TIMOL EM ENSAIOS ANTI-LEISHMANIA

CARVALHO, R. L.₁; VASCONCELLOS, R. S.₁; MACHADO, S. A.₁; AGRIPINO, J. M.₁; PINHEIRO, P. F.₂; SILVA, A. C. T.₂.

₁Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular (DBB); ₂Departamento de Química (DEQ)

Palavras-chave: *L. braziliensis*, Compostos Sintéticos, Proteína Fluorescente

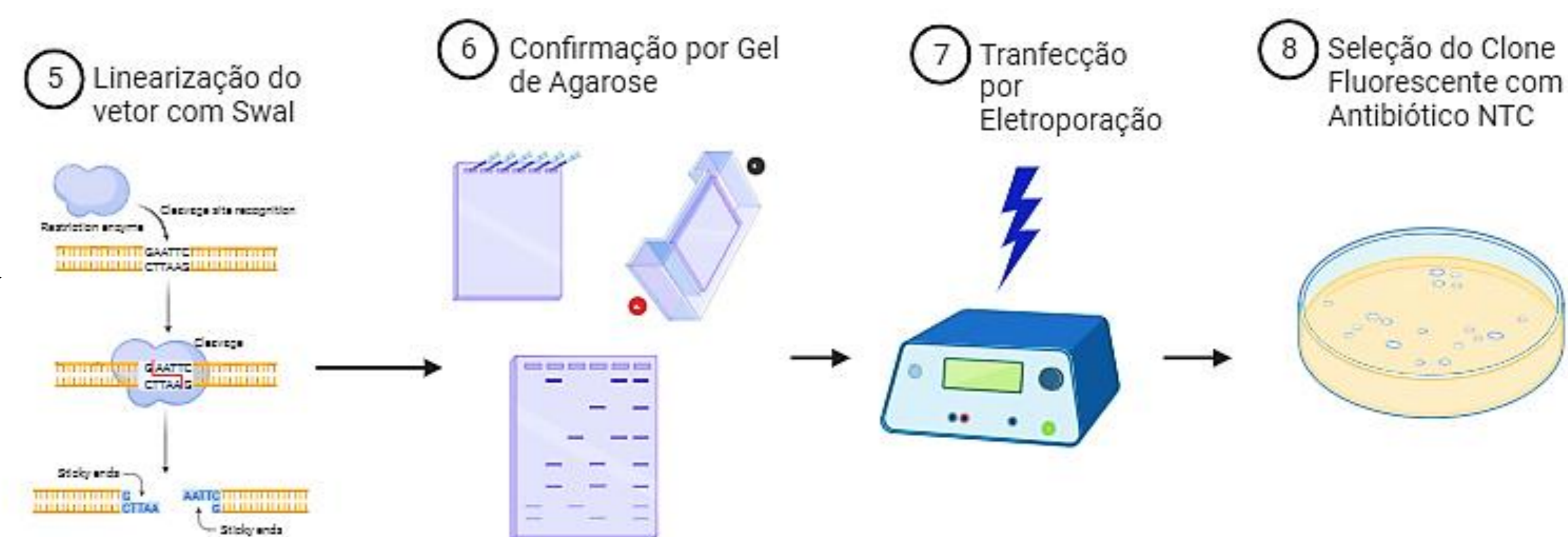
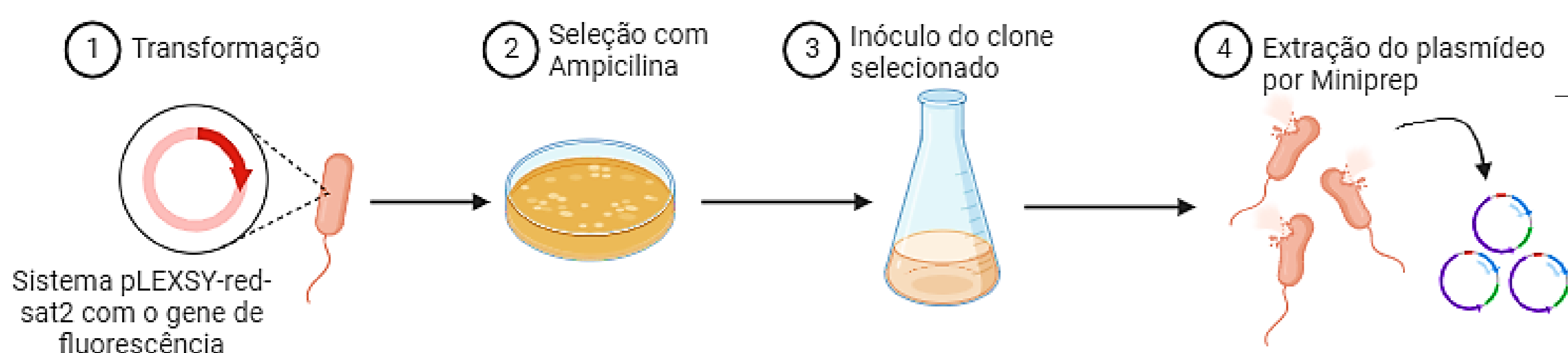
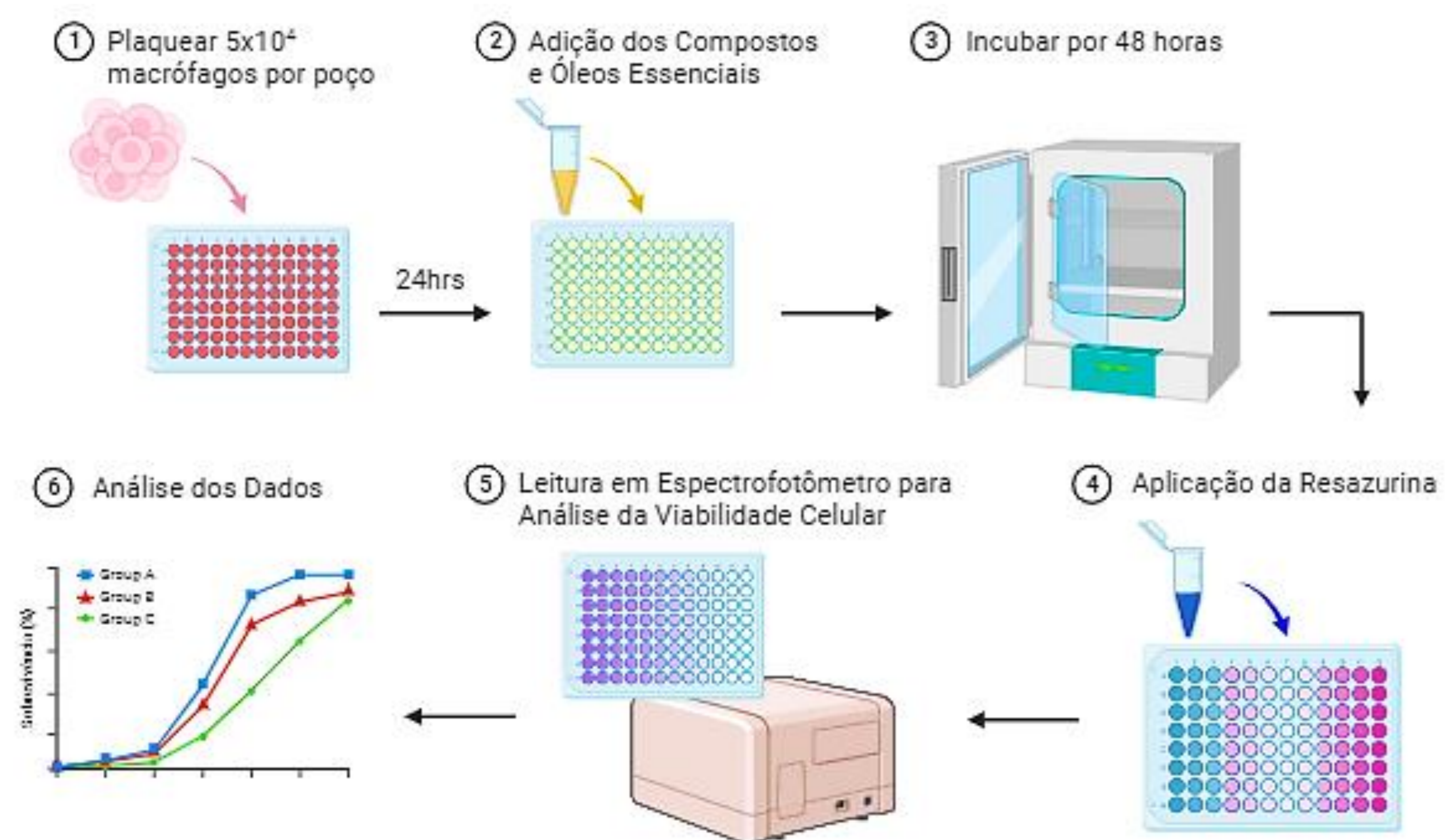
1 - Introdução

As leishmanioses são doenças infecciosas encontradas principalmente em áreas tropicais e subtropicais. Elas afetam predominantemente países mais pobres e comunidades sem acesso a saneamento básico. Essas doenças são causadas por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos aos humanos através da picada de flebotomíneos fêmeas infectados. A forma mais comum é a Leishmaniose Cutânea (LC), que está presente em 92 países e causa mais de 1 milhão de novos casos por ano. Os tratamentos atuais possuem eficácia limitada, são altamente debilitantes, necessitam de um grande número de doses, fazendo com que o tratamento seja de longa duração, além de causarem múltiplos efeitos adversos, devido a sua alta toxicidade. Portanto, há uma grande necessidade de desenvolver novos tratamentos que minimizem esses efeitos adversos.

2 - Objetivos

O presente trabalho tem como objetivos produzir parasitos que expressam proteína vermelho fluorescente para testes de viabilidade celular de *L. braziliensis* e avaliar a citotoxicidade de óleos essenciais (OE) de Alecrim, Carvacrol, Pimenta Rosa e Manjerição e compostos sintéticos derivados de moléculas naturais (carvacrol e timol) em macrófagos (modelo de célula hospedeira) e *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904.

3 - Material e Métodos



4 - Resultados e Discussão

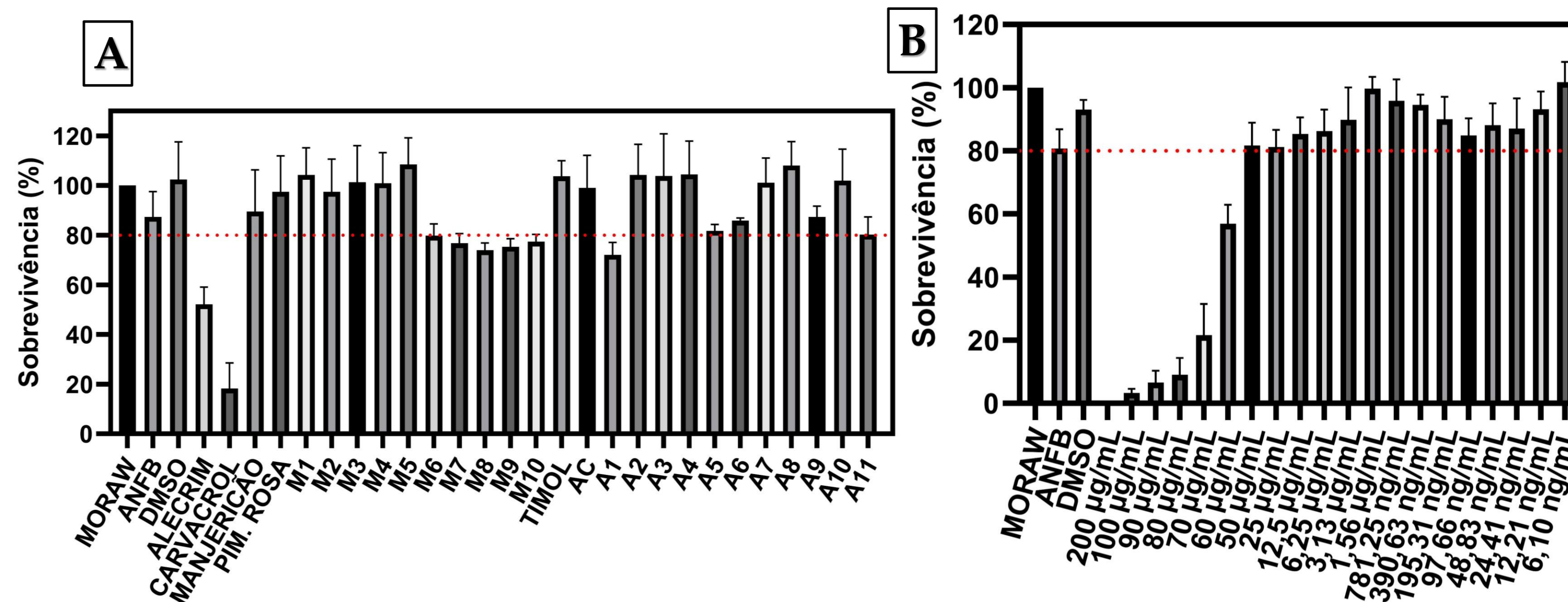


Fig. 1 - Resultados dos testes. A) Dados do teste de citotoxicidade dos óleos essenciais ($100 \mu\text{g/mL}$) e compostos sintéticos ($10 \mu\text{M}$), com base estipulada em 80% de sobrevivência. B) Dados da Análise de CC₅₀ do óleo essencial de Carvacrol. Todos os testes tiveram MORAW como controle de células sem tratamento, ANFB como anfotericina B, utilizado de controle por ser um conhecido tratamento para leishmaniose, e DMSO, como controle por ser utilizado como diluente dos compostos.

Nos testes de triagem inicial (Fig.1A) dos compostos sintéticos com concentração fixa em $10 \mu\text{M}$, em sua maioria houve taxa de sobrevivência dos macrófagos acima de 80%, com exceção dos compostos M5 a M10 e A1, que apresentaram sobrevivência abaixo de 80%. Porém devido a base na literatura quanto à possível ação leishmanicida, todos serão encaminhados para os ensaios de infecção. Quanto aos OEs (Fig.1A), Manjerição e Pimenta Rosa, apresentaram taxas de sobrevivência acima de 80% na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, enquanto Alecrim ficou entre 50% de sobrevivência, porém por se tratar de um OE complexo com diversos componentes com forte utilização farmacológica, o mesmo será encaminhado para futuros testes para definição do CC₅₀. Quanto ao Carvacrol na triagem inicial na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ apresentou alta taxa de toxicidade, e portanto foi realizado a definição do CC₅₀ (Fig.1B), sendo definido como $62,5 \mu\text{g/mL}$, possuindo 80% de sobrevivência em $50 \mu\text{g/mL}$. A *Leishmania* foi transfectada com o material genético do sistema pLEXY-red-sat2 através de eletroporação, crescendo em meio BHI suplementado e a seleção do clone recombinante ocorreu com o uso do antibiótico Nourseothricin (NTC), que apenas os parasitos transformados apresentaram resistência.

5 - Conclusões

Portanto podemos concluir que todos os compostos sintéticos serão encaminhados para os testes de infecção utilizando a concentração de $10 \mu\text{M}$. Enquanto o OE de Manjerição e Pimenta Rosa serão testados na infecção na concentração de $100 \mu\text{g/mL}$, enquanto o OE de Alecrim será feito novos testes para concentrações em que houver maior sobrevivência das células, e o OE de Carvacrol será testado na concentração de $50 \mu\text{g/mL}$ devido a sobrevivência de 80% dos macrófagos. A transfecção por eletroporação do material genético do sistema pLEXY-red-sat2 na *Leishmania* ocorreu com sucesso, com fluorescência analisada em microscópio de fluorescência. Estando os parasitos dessa forma preparados para serem utilizados nos ensaios *in vitro* de infecção posteriores.