

REPOSICIONAMENTO DE FÁRMACO: AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA *in vitro* DO FÁRMACO FLUCONAZOL FRENTE À *L. amazonensis*

SOUZA, Nathália Lima¹; OLIVEIRA, Sharon Rose Aragão Macedo¹

Centro Universitário São Lucas - AFYA Educacional¹;

INTRODUÇÃO: As Leishmanioses englobam um conjunto de comorbidades infecto-parasitárias e não contagiosas causadas por parasitas do gênero *Leishmania*. A transmissão acontece pela picada do inseto hematófago denominado flebotomíneo. Há duas divisões da doença: a leishmaniose tegumentar (LT) e a leishmaniose visceral, ou conhecida popularmente como calazar. Neste projeto, são abordadas alternativas terapêuticas voltadas para a Leishmaniose Tegumentar, responsável por causar lesões de pele, em média de 2-8 semanas após a picada do inseto e, em casos mais graves, como acontece no subtipo de LT (leishmaniose mucosa), a lesão progride para as mucosas do nariz e da boca, por disseminação hematogênica e linfática, o que pode resultar em deformidades com desfiguração facial causando prejuízos na esfera psicológica e social na vida dos pacientes. O tratamento de primeira escolha para LT são os antimoniais pentavalentes por via endovenosa, em vigência há mais de 60 anos e, não obstante, é responsável por efeitos adversos importantes, resultando em urgência de novas medidas terapêuticas. Quanto ao ciclo biológico, ao se alimentar do hospedeiro infectado pelo parasita *Leishmania*, a fêmea do flebotomíneo ingere sangue com macrófagos, e monócitos infectados, essa categoria parasitária é denominada amastigota, caracterizada pela forma arredondada, imóvel, intracelular e usa o sistema imune (macrófagos) para se replicar. Uma vez dentro do trato digestório do inseto, o modelo amastigota se transformará em promastigota, espécie flagelada, extracelular e infectante para o homem. Ao fazer o repasto sanguíneo novamente, a forma promastigota cairá na circulação do novo hospedeiro e irá desencadear a resposta imune, retomando a formação do parasita intracelular novamente. **OBJETIVO:** Avaliar os efeitos da reposição do fluconazol frente à *L. amazonensis in vitro* e compará-los com os efeitos dos fármacos convencionais (pentamidina e anfotericina B). **MATERIAL E MÉTODOS:** De modo geral, foi analisado a atividade do fluconazol sobre as formas promastigotas (extracelular) e amastigotas (intracelular) da Leishmaniose Tegumentar (*L. amazonensis*). Sendo assim, as formas parasitárias mencionadas foram obtidas (congeladas) da CLIOC (Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz). Logo após o descongelamento, as formas promastigotas foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino, principalmente, a cultura foi mantida a 24 °C, dentro da estufa. Foi adicionado eritrosina B 0,04% em uma fração de parasitos em fase de crescimento e contada em câmara de Neubauer espelhada em microscópio (aumento de 400×). Os parasitos (promastigotas) de cor vermelha são considerados mortos, os vivos costumam se apresentar em dupla refração e móveis, conforme o cálculo desenvolvido por Stauber e colaboradores (1958). Mediante os cálculos, 5×10^5 promastigotas/mL são colocadas em meio RPMI/10% SFB. Assim, são mantidos a 24 °C. Para avaliar a atividade leishmanicida sobre a promastigotas de *L. amazonensis* é utilizado o método da resazurina (ROLÓN et al., 2006). De início, foram utilizadas placas para cultura celular de 96 poços Jet biofil®, onde foi adicionado 180µL de meio RPMI suplementado com as formas promastigotas de *L. (L.) amazonenses* (1×10^6 /mL) em cada poço e foram adicionadas 20 µL do fármaco testado. O fluconazol foi testado em diluição seriada entre as concentrações de 0,065 até 0,022 µM. Para o controle negativo foi utilizado promastigotas em meio RPMI 1640, quanto ao controle positivo foi utilizado promastigotas tratadas com Pentamidina e branco foi utilizado meio RPMI 1640. As placas foram incubadas a 24 °C, por

um período de 72 h em estufa BOD. Foram adicionados 20 µL de resazurina depois da incubação, a uma concentração inicial de 2 mM diluído em PBS. Após 5 h de incubação a 24 °C, a fluorescência foi determinada com auxílio do espectrofotômetro Synergy HT (BioTek) com excitação de 530/25 e emissão de 590/35. Os valores foram processados pelo programa Gen5®. Dois experimentos foram feitos, de forma independente e em triplicata. Posterior a lise controlada no momento da incubação, as amastigotas de *L. (L.) amazonensis* deverão entrar em contato com o meio e com a temperatura reduzida, assim diferenciaram em promastigotas que foram quantificadas. Para tanto, 20 µL de uma solução de resazurina a 2 mM (Sigma, USA) será adicionado a microplaca e incubada a 24 °C por 5 h. Os resultados serão expressos nos valores de Índice de Inibição de Crescimento de amastigotas (ICA⁵⁰) conforme o cálculo que engloba a fluorescência obtida em espectrofotômetro. **RESULTADOS E DISCUSSÃO:** A toxicidade dos fármacos foi avaliada *in vitro* em culturas de promastigotas e células THP-1. Conforme os dados de IC⁵⁰ e CC⁵⁰ é possível obter o Índice de Seletividade (IS). Na tabela 1, demonstra os fármacos já utilizados no tratamento com atividade leishmanicida comprovada (pentamidina e anfotericina B), bem como o fármaco de escolha (fluconazol). É válido ressaltar que nessa pesquisa, as duas formas parasitárias foram cultivadas e tratadas com fluconazol, e depois comparadas com os estudos anteriores em que já foram estabelecidos o desvio-padrão médio de atividade dos fármacos convencionais (pentamidina e anfotericina B), e que nessas literaturas onde foram estabelecidas o desvio-padrão, não foram utilizados métodos diferentes para determinar IC⁵⁰, CC⁵⁰ e IS.

Tabela 1- Avaliação de atividade leishmanicida dos fármacos com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e citotóxica contra células THP-1.

Fármacos	IC ₅₀ (µM) ± EP <i>L. (L.) amazonensis</i>	CC ₅₀ (µM) ± EP THP-1	Índice de Seletividade
Pentamidina	0,44 ± 0,09	30,17 ± 9,13	68,57
Anfotericina B	0,06 ± 0,02	6,97 ± 2,2	154,89
Fluconazol	>0,65	>0,65	--

IC₅₀ - inibição de crescimento de 50% dos parasitos; CC₅₀ – concentração citotóxica para 50% da população celular - resultados corresponde à média de três experimentos para cada amostra e erro padrão da média (EP);

Pode-se observar que os fármacos já usados possuem IC⁵⁰ bem abaixo, ou seja, é necessária uma concentração baixa do fármaco para se ter o efeito leishmanicida desejado. Enquanto isso, o fluconazol não obteve IC⁵⁰, pois com 0,65 µM, a concentração máxima testada do fármaco, não foi encontrado uma inibição de 50% das promastigotas, o que sugere uma atividade leishmanicida baixa, ou inexistente perante a forma promastigota. Conforme a Tabela 1, quando se compara a atividade citotóxica dos fármacos sobre a viabilidade da linhagem celular THP-1, observa-se que os valores de CC⁵⁰, da pentamidina e da anfotericina B apresentaram resultados abaixo de 30 µM, no entanto, o fluconazol não apresentou atividade citotóxica (CC⁵⁰) contra THP-1 na maior concentração testada (0,65 µM), dessa maneira, não foi possível determinar o CC⁵⁰ do fluconazol. Quanto ao Índice de Seletividade, a anfotericina B, apresenta melhor índice já comprovado, IS: 154,98 para a linhagem THP-1. Como mencionado antes, para o cálculo do índice, são necessários os valores de IC⁵⁰ e CC⁵⁰, no entanto, não houve valor de citotoxicidade na concentração máxima do medicamento de escolha (fluconazol), o que explica a ausência do IS na Tabela 1, não sendo possível compará-los entre si quanto ao Índice de Seletividade. A ausência de atividade anti-promastigota do fluconazol já norteia uma resposta previsível para a segunda etapa deste estudo com amastigota, resultando em uma provável baixa atividade leishmanicida esperada. A resposta de dose de cada fármaco para determinar a inibição de crescimento de 50% das formas

amastigotas (ICA⁵⁰) em células THP-1 foi medida indiretamente através do crescimento das formas promastigotas diferenciadas após o tratamento (72 horas) e lise controlada dos macrófagos. As amastigotas sobreviventes ao tratamento se transformaram em promastigotas diferenciadas após a morte das células hospedeiras, e os valores de fluorescência foram obtidos pelo método de resazurina. Para o cálculo de ICA⁵⁰ foi considerado o controle as células THP-1 infectadas sem tratamento, na tabela 2 é representado os resultados de ICA⁵⁰

Tabela 2- Avaliação da ação leishmanicida com amastigota de *L. (L.) amazonenses*, citotóxica contra células THP-1 e IS dos fármacos selecionados.

Fármacos	ICA ⁵⁰ (μ M) \pm EP	CC ⁵⁰ (μ M) \pm EP	IS
	<i>L. (L.) amazonensis</i>	THP-1	
Pentamidina	2,09 \pm 0,53	30,17 \pm 9,14	14,46
Anfotericina B	0,26 \pm 0,08	6,97 \pm 2,2	25,25
Fluconazol	> 0,65	>0,65	--

ICA⁵⁰ - inibição de crescimento de 50% dos parasitos; CC⁵⁰ – concentração citotóxica para 50% da população celular - resultados corresponde à média de três experimentos para cada amostra e erro padrão da média (EP); IS – índice de seletividade *L. (L.) amazonensis* frente a célula THP-1.

Observou-se que a anfotericina B apresentou o melhor resultado leishmanicida quando comparada aos demais fármacos, isto é, uma menor concentração desse antifúngico (0,26 μ M) representa uma atividade leishmanicida considerável. Observa-se que o resultado de ICA⁵⁰ para o fluconazol, não apresentou atividade leishmanicida na maior concentração testada do medicamento (0,65 μ M), com isso, não foi possível determinar ICA⁵⁰, pois não gerou efeito inibitórios sobre 50% das amastigotas, o que representa também a ausência de Índice de Seletividade. **CONCLUSÃO:** Com o estudo realizado sobre o fármaco em questão, conclui-se que o fluconazol não apresentou a atividade biológica esperada contra nenhuma de ambas as formas de *L. (L.) amazonensis*, ora promastigota (extracelular), ora amastigota (intracelular). Isto é, não foi identificada a atividade leishmanicida suspeitada. Logo, os resultados obtidos demonstraram que o antifúngico em questão não possui eficiência contra o parasito *in vitro*.

AGRADECIMENTOS: Agradecimentos especiais à professora Sharon Aragão pela orientação exemplar, apoio incansável e insights importante que foram fundamentais para o sucesso deste trabalho. Gostaria de expressar os mais sinceros agradecimentos a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), em especial ao Laboratório de Plataforma Técnica RPT11G de Bioensaios de Malária e Leishmaniose (PBML), pela assistência e recursos valiosos durante a realização deste projeto. Ademais, agradecer a FIOCRUZ pela oportunidade de aprender com os especialistas e utilizar as instalações de ponta do PBML, o que enriqueceu significativamente nossa pesquisa, em especial, a especialista Auriléia, pelo auxílio e apoio prestados. Também gostaria de agradecer ao CNPq e à Faculdade São Lucas pelo suporte de pesquisa científica e por proporcionar a experiência de estar em contato com essa área de grande relevância no mundo acadêmico proporcionado pelo PIBIC.

Palavras-Chaves: Leishmaniose Tegumentar; *Leishmania amazonensis*; Alternativa terapêutica; Fluconazol.

E-mail: nathalima1@outlook.com;