



Atividade leishmanicida de metabólito produzido por *Streptomyces* sp. frente a *Leishmania amazonensis*

Leishmanicide activity of metabolite produced by *Streptomyces* sp. against *Leishmania amazonensis*

Kamila Carvalho Nogueira¹, Carlos Drielson da Silva Pereira², Rita de Cássia Mendonça de Miranda³, Amanda Silva dos Santos Aliança⁴

Resumo: A Leishmaniose tegumentar é uma doença tropical e subtropical infecciosa não contagiosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, é transmitida ao homem vetorialmente por fêmeas infectadas do mosquito do gênero *Lutzomia*. Clinicamente a Leishmaniose tegumentar está subdividida em: cutânea, cutânea difusa e muco cutânea. A forma cutânea é a apresentação mais comum de leishmaniose, responsável por mais de 90% dos casos do Brasil. O objetivo do projeto foi avaliar a atividade leishmanicida, atividade citotóxica e atividade hemolítica do metabólito W.T produzido por *Streptomyces* sp. frente a *Leishmania amazonensis*. Formas promastigotas da *Leishmania amazonensis* foram cultivadas em meio Schneider até alcançarem fase exponencial, quando foram submetidas a ensaios de atividade leishmanicida na presença de concentrações diferentes do metabólito W.T. Foram realizados testes de citotoxicidade com células HEP-2. Para a atividade hemolítica preparou-se solução de hemácias e solução de trabalho para montagem dos testes. O metabólito W.T apresentou IC₅₀ de 9,0±0,9 µg/ml frente a *Leishmania amazonensis* e inibição de 100% do crescimento parasitário nas três maiores concentrações. A CC₅₀ calculada para o metabólito W.T foi de 226,2 µg/ml. O índice de seletividade (IS), teve valor igual a 24,85 e foi mais seletivo aos parasitas do que as células de mamífero. Em todas as concentrações testadas o metabólito não apresentou atividade hemolítica, e não houve uma discrepância estatística entre os resultados. O metabólito W.T demonstrou resultados satisfatórios e promissores de atividade leishmanicida, o que faz dele um forte candidato para fabricação de novos compostos no combate a leishmaniose.

Palavras-chave: Leishmaniose; Leishmaniose tegumentar; *Leishmania amazonensis*; Produtos naturais.

Abstract: Tegumentary leishmaniasis is a non-contagious infectious tropical and subtropical disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, transmitted to man vectorally by females infected with the mosquito of the genus *Lutzomia*. Clinically, tegumentary leishmaniasis is subdivided into: cutaneous, diffuse cutaneous and cutaneous mucus. Cutaneous form is the most common presentation of leishmaniasis, responsible for more than 90% of cases in Brazil. The objective of this project was to evaluate the leishmanicide activity, cytotoxic activity and hemolytic activity of the metabolite W.T produced by *Streptomyces* sp. in front of *Leishmania amazonensis*. Promastigote forms of *Leishmania amazonensis* were cultivated in Schneider medium until they reached exponential phase,

¹ Acadêmica do 7º período do curso de Biomedicina da Universidade CEUMA. E-mail: kamilacarvalho.ng@gmail.com

² Mestre em Biologia Microbiana pela Universidade CEUMA. E-mail: drielsonn.sousa@gmail.com

³ Docente do Programa de Mestrado Acadêmico em Meio Ambiente da Universidade CEUMA. Membro do Grupo de Pesquisa Química Tecnológica e Ambiental CEUMA. E-mail: ritamend30@gmail.com

⁴ Docente do curso de Biomedicina e dos Programas de Mestrado em Biologia Microbiana e Gestão de Programas e Serviços de Saúde da Universidade CEUMA. E-mail: amanda.alianca@ceuma.br



when they were submitted to leishmanicide activity assays in the presence of concentrations different from the metabolite W.T. Cytotoxicity tests were performed with HEp-2 cells. For hemolytic activity, a red blood cell solution and working solution were prepared to assemble the tests. The metabolite W.T presented IC_{50} of 9.0 ± 0.9 $\mu\text{g/ml}$ against *Leishmania amazonensis* and inhibition of 100% of parasitic growth in the three highest concentrations. The CC_{50} calculated for the metabolite W.T was 226.2 $\mu\text{g/ml}$. The selectivity index (SI) had a value of 24.85 and was more selective to parasites than mammalian cells. In all concentrations tested the metabolite did not present hemolytic activity, and there was no statistical discrepancy between the results. The metabolite W.T demonstrated satisfactory and promising results of leishmanicide activity, which makes it a strong candidate for the manufacture of new compounds in the fight against leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis; Tegumentary leishmaniasis; *Leishmania amazonensis*; Biological products.

1. INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária, causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. O protozoário é transmitido para humanos através da picada da fêmea de insetos flebotomíneos, sendo os gêneros *Lutzomia* e *Phelebotomus* os mais amplamente distribuídos. A doença pode se manifestar de duas formas, Tegumentar (cutânea, cutânea difusa e muco cutânea) e Visceral, sendo essas manifestações clínicas dependentes das espécies causadoras da infecção, e da relação protozoário e hospedeiro (PEREIRA, 2010; GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa que acomete o homem e provoca úlceras na pele e mucosas das vias aéreas superiores. A infecção pode ser sintomática ou assintomática, dependendo do grau de suscetibilidade de cada paciente. Dependendo da espécie de leishmania e da resposta imune do indivíduo infectado, pode-se desenvolver diferentes padrões de formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose muco cutânea (LMC). (MACHADO, 2014).

No Brasil até a década de 70, todos os casos de LT eram atribuídos a *Leishmania braziliensis*. Com o aprimoramento das técnicas de análise e a intensificação de estudos ecológicos e epidemiológicos, outras espécies foram descritas, sendo reconhecidas sete espécies causadoras da doença no Brasil, dentre as quais *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* são as principais espécies do ponto de vista da saúde pública. O vetor dos protozoários da LT são as fêmeas infectadas do mosquito do gênero *Lutzomia*. Sua transmissão pode ocorrer tanto na mata quanto em meios urbanos, especialmente em áreas próximas em que a vegetação nativa foi destruída (BASANO; CAMARGO, 2004; MACHADO, 2014).



A leishmaniose tegumentar é um problema de saúde pública e de notificação compulsória, e quando não tratada corretamente pode evoluir para quadros mais graves. Os fármacos de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose tegumentar são os antimoniais, ressaltando que existem outros esquemas terapêuticos, e aqueles sugeridos pela OMS para padronizar o tratamento. O grande problema desses fármacos de primeira escolha está relacionado com a alta toxicidade, podendo trazer impactos negativos para o paciente conforme a dose ou o modo em que é usado (VASCONCELOS et al., 2018).

As bactérias têm se destacado no mercado por apresentarem a capacidade de sintetizarem uma grande quantidade de metabólitos secundários com atividade biológica. Destaca-se como uma importante fonte desses metabólitos, espécies de *Streptomyces* spp., que estão presentes em variados habitats, sendo o solo um dos mais abundantes, onde constituem aproximadamente 30% dos microrganismos. Actinobactérias em geral, e em particular o gênero *Streptomyces*, continuam sendo fonte de novos metabólitos secundários com uma grande variedade de atividades biológicas, tais como, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anticancerígenas, antiparasitárias, entre outras. Dessa forma a utilização de microrganismos de interesse biotecnológico isolados do solo tornou-se mais frequente e vem gerando a descoberta de novos metabólitos bioativos (BOMFIM, 2008).

A busca por tratamentos alternativos é de extrema importância. Atualmente muitos microrganismo naturais do solo têm demonstrado um alto potencial de ação contra espécies de Leishmanias, se tornando assim fortes candidatos para formulação de novas drogas. Assim tem-se como objetivo desse projeto avaliar a atividade leishmanicida, efeito citotóxico e atividade hemolítica do metabolito W.T produzido por *Streptomyces* sp. frente a *leishmania amazonensis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo dos metabólitos

O metabolito W.T produzido por *Streptomyces* sp. isolado do solo da Universidade Ceuma, campus Renascença foi concedido pela Dra. Rita de Cássia Mendonça de Miranda, pesquisadora do Laboratório de Microbiologia Ambiental (LAMAM) da Universidade Ceuma.

2.2 Cultivo dos parasitos

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram cultivadas em meio Schneider suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10% e antibiótico (1%) filtrado e estéril. Os parasitas



foram acondicionados em estufa B.O.D a temperatura 26-28°C nas proporções de 1:3. A manutenção das cepas foi feita há cada 72 horas, através de repiques nas mesmas proporções para manter a viabilidade parasitária, e alcançar fase exponencial de crescimento satisfatória para montagem dos experimentos.

2.3 Atividade biológica frente as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

A IC₅₀, que é a capacidade de um composto inibir 50% do crescimento parasitário, foi calculada ao final de cada experimento pelo software SPSS através de regressão linear. Cada experimento foi repetido 2 vezes em triplicata.

2.4 Atividade hemolítica

Para a atividade hemolítica preparou-se uma solução com 1% de sangue de carneiro comercial com PBS à 2% e uma solução de trabalho dos compostos. Após o preparo das soluções, foram montados os testes em placa de 96 poços com 5 concentrações dos metabólitos (100 a 6.25µg/ml), um controle positivo com H₂O₂ e um controle negativo com salina. Cada poço foi composto por 100µL da solução de hemácias mais 100µL da solução da solução de trabalho, exceto nos controles, e incubados por 3 horas sob agitação à 37°C. Por fim foi feita a leitura da absorbância por espectrofotometria (540nm) e calculados os valores da atividade hemolítica através da fórmula:

Hemólise (%) = (Abs. Do tratado - Abs. Do controle negativo) × 100 / (Abs. do controle positivo - Abs. do controle negativo).

2.5 Ação citotóxica dos metabólitos em células de mamíferos

As análise de citotoxicidade foram realizadas utilizando a técnica do MTT3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina). Foram utilizados 100µl da suspensão de células HEp-2 na concentração de 1×10⁴ células/ml. As células foram dispostas em placas de 96 poços sob 5 concentrações do metabólito W.T (200; 100; 50; 25; 12.5µg/ml), exceto nos controles que foram preenchidos com meio de cultura, e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após incubação foi inserido MTT nos poços da placa e incubado novamente por 3 horas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ protegida da luminosidade. Antes da leitura foi adicionado DMSO para solubilizar os cristais de formazan solidificados pela redução do MTT. A análise das placas foi feita por espectrofotometria a 540nm em leitor de ELISA.



O percentual de células viáveis foi calculado, e a partir do resultado foi possível calcular o percentual de células viáveis, a concentração capaz de causar efeito citotóxico em 50% das células (CC_{50}), que foi estimada através de análise de regressão logarítmica dos dados obtidos utilizando o software SPSS 8.0 para Windows. O índice de seletividade (IS) foi determinado com a razão entre os valores de CC_{50} e IC_{50} . Cada experimento foi realizado em dois experimentos distintos em duplicata.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade biológica frente as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Observa-se na figura 1 o metabólito W.T testado contra a *Leishmania amazonensis*, nas suas três maiores concentrações apresentou uma inibição de crescimento dos parasitos de 100%, sendo a inibição mais baixa observada na menor concentração do metabólito ($6,25\mu\text{g/ml}$). O valor de IC_{50} capacidade de um composto inibir 50% do crescimento parasitário, para o metabólito W.T. foi de $9,0\pm 0,9\mu\text{g/ml}$, calculado através de regressão linear pelo software SPSS.

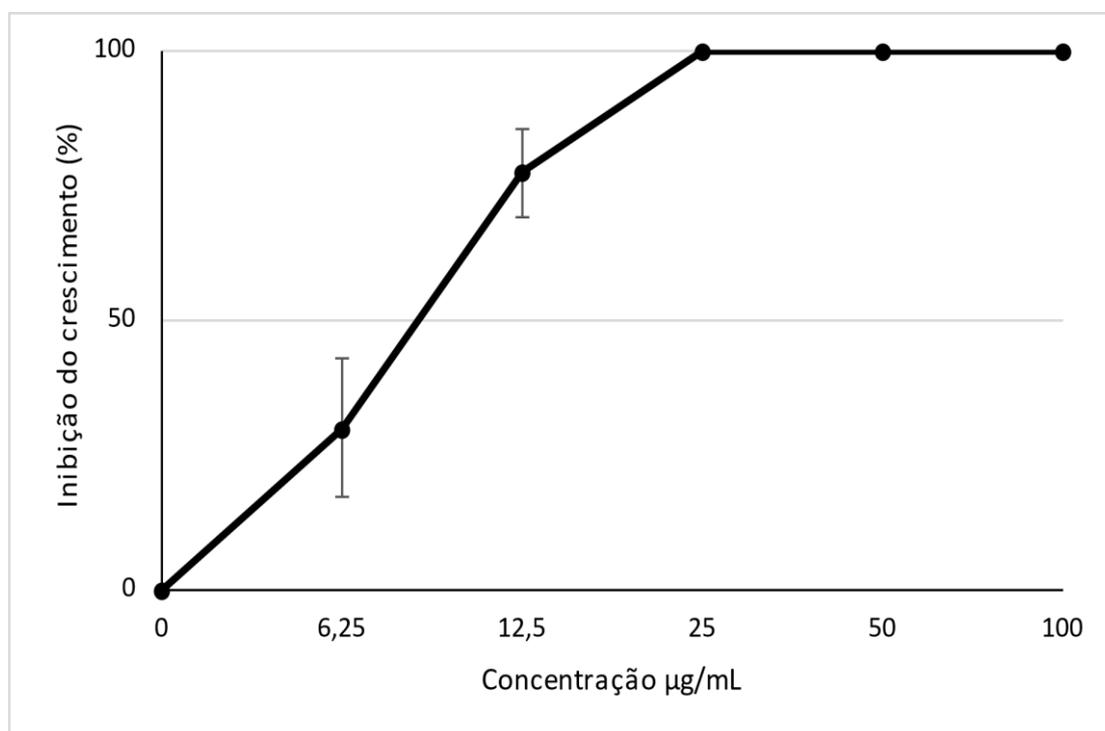


Figura 1. Curva de inibição de crescimento de *Leishmania amazonensis* tratada com o metabólito W.T.



3.2 Ação citotóxica do metabólito em células de mamíferos

Na figura 2 observa-se que o composto W.T apresenta toxicidade em sua maior concentração (200µg/ml) testada do metabólito W.T. Também é possível notar que nas demais concentrações a viabilidade celular foi superior a 85%, o que indica uma toxicidade baixa as células de mamíferos. Foram consideradas não tóxicas as concentrações que apresentaram viabilidade celular superior a 70% conforme Tunes e colaboradores (2015) assegura.

A CC_{50} do metabólito W.T foi calculada em 226,2µg/ml. O índice de seletividade ($IS = CC_{50}/IC_{50}$), que informa quanto o composto é seletivo para o parasito em relação às células de mamíferos, foi calculado e verificou-se que o metabólito W.T apresentou índice de seletividade (IS) igual a 24,85 que corroboram com os estudos de Aliança (2012), onde extratos de macroalgas foram mais seletivos aos parasitos que às células de mamíferos ($IS > 1$).

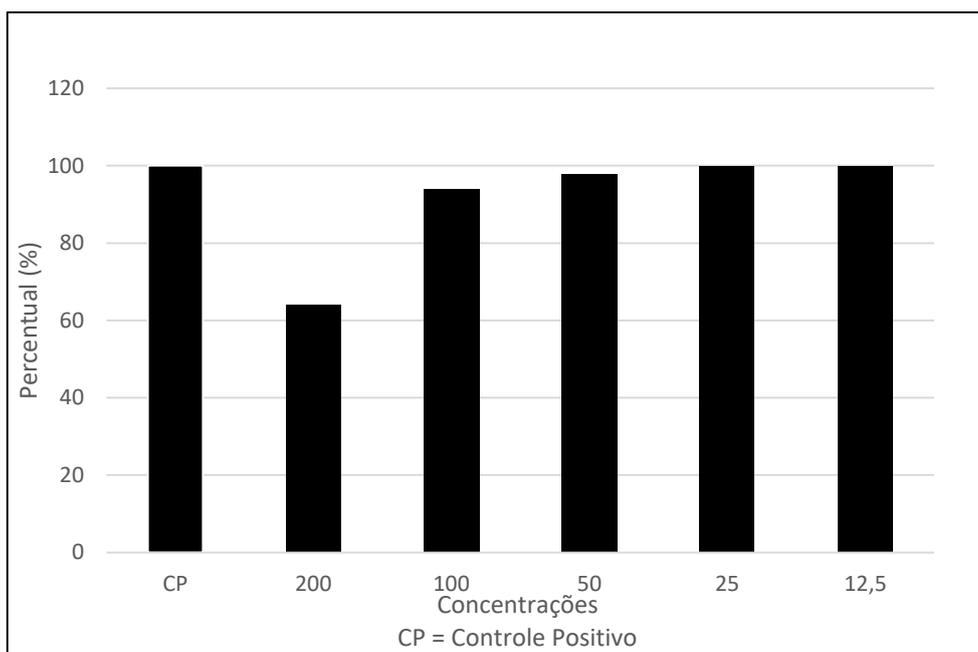


Figura 2. Ação citotóxica do metabólito W.T em células de mamíferos (HEp-2).

3.3 Índice de Hemólise

O índice de hemólise do metabólito W.T representado na figura 3, mostra que em todas as concentrações do extrato os valores foram bem próximos aos resultados encontrados no controle de hemácias imersas em PBS (controle negativo), não havendo discrepância estatística. Assim o metabólito não apresentou atividade hemolítica nas concentrações testadas. Szabo (2015) realizou



testes de hemólise com metabólitos secundários e fitoterápicos e concluiu que não havia riscos de hemólise nas concentrações em que o índice é igual ou inferior ao controle negativo.

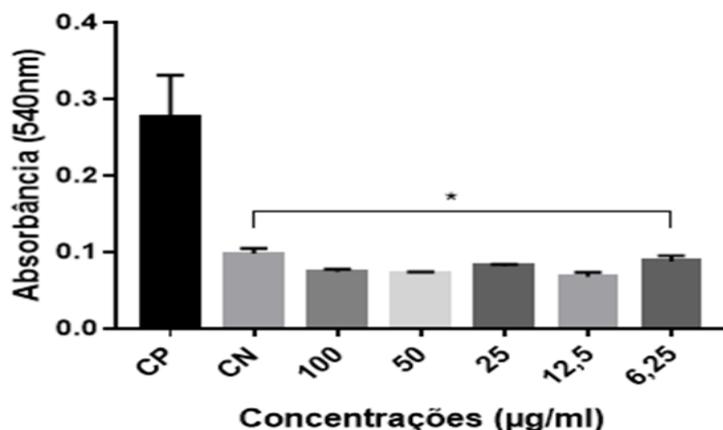


Figura 3. Avaliação do índice de hemólise do WT. As colunas marcadas com asterisco (*) representam a diferença estatística significativa (* = $p \leq 0.01$) em relação ao grupo controle positivo (CP) pelo teste ANOVA ($p < 0,05$), pós-Teste de Dunnett's.

4. CONCLUSÕES

O metabólito testado demonstrou resultados satisfatórios e promissores de atividade leishmanicida, o que faz dele um forte candidato para fabricação de novos compostos no combate a leishmaniose. Reforçou ainda que os metabólitos secundários de microrganismo retirados do solo, dentre outros locais naturais são de grande relevância para criação de novos fármacos, tendo em vista a variabilidade de microrganismos e facilidade de acesso a eles.

REFERÊNCIAS

ALIANÇA, Amanda Silva dos Santos. et al. **Estudo da atividade biológica de produtos naturais de macroalgas no litoral nordestino sobre Leishmania amazonensis.** 2012. Tese de Doutorado. Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

BASANO, Sergio de Almeida; CAMARGO, Luís Marcelo Aranha. **Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle.** Rev. Bras. Epidemiol. Vol. 7, N°3, 2004.



BOMFIM, Sâmea Mesquita. **ISOLAMENTO DE METABÓLITOS ANTIFÚNGICOS DE *Streptomyces* sp. UFPEDA 3347, ÉNDOFITO DE *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae).** Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Recife, 2008.

GONTIJO, Bernardo; CARVALHO, Maria de Lourdes Ribeiro de. **Leishmaniose tegumentar americana. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.** 36(1):71-80, jan-fev, 2003.

MACHADO, Michelle Menezes. **ANÁLISE DE DIFERENTES CEPAS DE *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* E *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* QUANTO A INFECTIVIDADE/VIRULÊNCIA E PERFIL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PRODUZIDAS POR MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS.** Mestrado em Programa de Pós-Graduação Biologia Parasitária. FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Rio de Janeiro, 2014.

PEREIRA, Bernardo Acácio Santini. ***Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis*: Participação de fatores do hospedeiro e do parasito no curso da infecção experimental em camundongos.** Pós-Graduação em Biologia Parasitária. INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Rio de Janeiro, 2010.

SZABO, Ellis Marina. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas (antioxidante, antimicrobiana, tóxica e hemolítica in vitro) de *Cestrum intermedium* Sendtn. (Solanaceae).**

TUNES, Luiza Guimarães et al. **Investigação da Atividade e Mecanismos de Ação Leishmanicida e/ou Tripanocida de Produtos Naturais e um Derivado.** 2015. Tese de Doutorado.

VASCONCELOS, Jairla Maria. et al. **Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. Revista RBAC.** Vol. 50, N° 03, 2018. Pp