

Título em Português: Investigação dos Efeitos Antiparasitários de Candidatos a Fármacos para a Leishmaniose Visceral.

Título em Inglês: Investigation of the Antiparasitic Effects of Drug Candidates for Visceral Leishmaniasis

Autor: Giuseppe Felice Marques da Cunha

Instituição: Universidade de São Paulo

Unidade: Instituto de Física de São Carlos

Orientador: Adriano Defini Andricopulo

Área de Pesquisa /
SubÁrea: Biofísica Molecular

Agência Financiadora: USP - Programa Unificado de Bolsas

INVESTIGAÇÃO DOS EFEITOS ANTIPARASITÁRIOS DE CANDIDATOS A FÁRMACOS PARA A LEISHMANIOSE VISCERAL

Giuseppe Felice Marques da Cunha

Analú Rocha Costa

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

Instituto de Física de São Carlos/Universidade de São Paulo

giuseppe.felice@usp.br

Objetivos

Este projeto objetiva avaliar uma série de 12 compostos candidatos a fármacos contra leishmaniose visceral, caracterizados pela presença das identidades químicas indolizinas e pirróis, através de bioensaios *in vitro*, analisando sua atividade antiparasitária frente à espécie *Leishmania infantum*, bem como sua seletividade quando em contato com duas linhagens de células hospedeiras.

Métodos e Procedimentos

Para o estudo de atividade antiparasitária dos candidatos, foi utilizada a linhagem celular de leucemia monocítica humana (THP-1) a qual foi cultivada em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/streptomicina, e semeadas $2 \cdot 10^4$ células/poço. Estas foram então diferenciadas em macrófagos com PMA (20 ng/mL) e, após 72 horas de incubação a 37°C e 5% de CO₂, foram infectadas com $2 \cdot 10^5$ parasitas de *L. infantum* (cepa MHOM/MA67/ITMAP-263) por poço em sua forma promastigota. Após 24 horas, os candidatos a fármaco foram então adicionados nas concentrações de 0,12-64 µM e, então, após novas 120 horas, as células foram fixadas com metanol e coradas com Giemsa 20%. Como controle negativo foram

cultivados poços sem adição de compostos (apenas RPMI 1640, THP-1 e parasita) e como controle positivo foi realizado tratamento com a Miltefosina nas mesmas concentrações dos compostos. Por fim, o número médio de amastigotas intracelulares por célula THP-1 foi determinado por contagem manual usando um microscópio e a Concentração Inibitória de 50% dos parasitas (IC₅₀) foi calculada.

Para a citotoxicidade utilizou-se células THP-1, cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB e 1% de penicilina/streptomicina, semeadas na concentração de $2 \cdot 10^4$ células/poço, e incubadas a 37°C e 5% de CO₂. Após 24 horas os compostos em teste foram adicionados nas concentrações de 0,12-64 µM, em duplicata. A Doxorubicina foi utilizada como controle positivo nas concentrações 0,05-6,4 µM e foram cultivados poços sem adição de compostos como controle negativo. Passadas 72 horas, 15 µL de resazurina foram adicionados aos poços e a absorbância foi aferida através de leitura no SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices) com comprimento de excitação em 538nm. Com estes dados Concentração Citotóxica de 50% das células (CC₅₀) foi então determinada para avaliação de seletividade.

Resultados

Dos experimentos realizados para a determinação de atividade antiparasitária, receberam destaque os candidatos contendo pirróis (compostos 1 a 4), como mostrado na figura 1 abaixo:

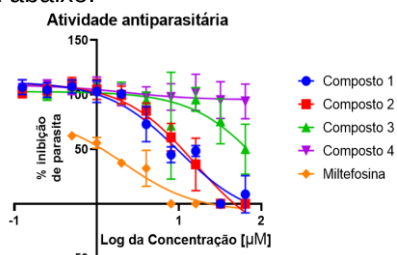


Figura 1: Gráfico de atividade antiparasitária para compostos contendo pirróis

Em especial os compostos 1 e 2, que apresentaram IC_{50} de, respectivamente, de $10,02 \pm 0,37$ e $16,03 \pm 2,65$ $[\mu M \pm SD]$ foram os únicos mais próximos ao fármaco de referência (Miltefosina), com IC_{50} de $2,30 \pm 1,02$.

Nos ensaios de citotoxicidade por outro lado, destacaram-se os compostos caracterizados pela presença de grupo indolizina, apresentando, em sua maioria, $CC_{50} > 64\mu M$ como nota-se nos gráficos das figuras 2 e 3:

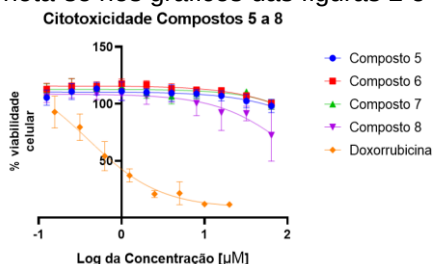


Figura 2: Gráfico de citotoxicidade para compostos (5 a 8) contendo indolizinas

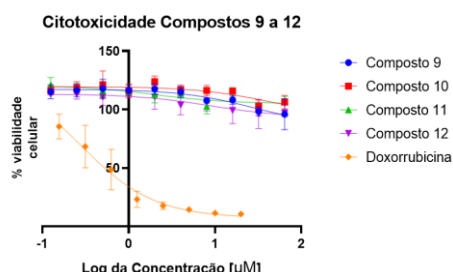


Figura 3: Gráfico de citotoxicidade para compostos (9 a 12) contendo indolizinas

Como foi possível notar, a presença de indolizina propicia uma viabilidade celular bem mais elevada quando se comparada com o fármaco referência (Doxorrubicina), o qual apresentou CC_{50} de $0,40 \pm 0,04$ $[\mu M \pm SD]$. É válido ressaltar que os compostos pirrólicos 1 e 2, destacados pelo razoável IC_{50} , apresentaram CC_{50} de $18,12 \pm 1,18$ e $27,13 \pm 1,30$, respectivamente, os quais mantiveram-se acima da referência.

Conclusões

Neste panorama, é possível concluir que compostos contendo a identidade química pirrol tem algum potencial no caráter inibitório, como foi demonstrado pelos candidatos 1 e 2 que, apesar de menos ativos que a referência, mantiveram-se próximos a esta.

Já os compostos contendo indolizinas apresentaram baixa citotoxicidade, sendo uma opção a ser explorada caso consiga-se uma boa atividade antiparasitária conjuntamente a esta propriedade, o que se pretende avaliar em segmento do projeto.

Em âmbito geral, os compostos 1 e 2 diferem-se dos demais pois apresentaram simultaneamente razoável atividade inibitória e citotoxicidade inferior à do fármaco referência, podendo ser melhor investigados em continuação do projeto.

Agradecimentos

A bolsa PUB (Programa Unificado de Bolsas), e a todos que, à sua maneira, contribuíram para a realização deste projeto.

Referências

1. FERREIRA, L. L. G.; MORAES, J.; ANDRICOPULO, A. D. Approaches to advance drug discovery for neglected tropical diseases. Drug Discovery Today, [S.L.], v. 27, n. 8, p. 2278-2287, 2022.

INVESTIGATION OF THE ANTIPARASITIC EFFECTS OF DRUG CANDIDATES FOR VISCERAL LEISHMANIASIS

Giuseppe Felice Marques da Cunha

Analú Rocha Costa

Prof. Dr. Adriano Defini Andricopulo

São Carlos Institute of Physics/University of São Paulo

giuseppe.felice@usp.br

Objectives

This project aims to evaluate a series of 12 drug candidate compounds against visceral leishmaniasis, characterized by the presence of indolizine and pyrrole chemical identities, through *in vitro* bioassays. The analysis focuses on their antiparasitic activity against the *Leishmania infantum* species, as well as their selectivity when in contact with two host cell lines.

Methods and Procedures

For the antiparasitic activity study of the candidates, the human monocytic leukemia cell line (THP-1) was used, cultivated in RPMI 1640 medium, supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin, with $2 \cdot 10^4$ cells/well seeded. These cells were then differentiated into macrophages using PMA (20 ng/mL), and after 72 hours of incubation at 37°C and 5% CO₂, they were infected with $2 \cdot 10^5$ *L. infantum* (strain MHOM/MA67/ITMAP-263) parasites per well in their promastigote form. After 24 hours, the drug candidates were added at concentrations ranging from 0.12-64 µM, and after an additional 120 hours, the cells were fixed with methanol and stained with Giemsa 20%. As a negative control, wells were cultivated without the addition of compounds

(only RPMI 1640, THP-1, and parasite), and Miltefosine treatment was used as a positive control at the same concentrations as the compounds. Finally, the average number of intracellular amastigotes per THP-1 cell was determined by manual counting using a microscope, and the 50% inhibitory concentration (IC₅₀) of the parasites was calculated.

For cytotoxicity, THP-1 cells were used, cultivated in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin, seeded at a concentration of $2 \cdot 10^4$ cells/well, and incubated at 37°C and 5% CO₂. After 24 hours, the test compounds were added at concentrations ranging from 0.12-64 µM in duplicate. Doxorubicin was used as a positive control at concentrations of 0.05-6.4 µM, and wells without compound addition were used as a negative control. After 72 hours, 15 µL of resazurin were added to the wells, and absorbance was measured on the SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices) with an excitation wavelength of 538 nm. Based on these data, the 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) for the cells was determined to evaluate selectivity.

Results

From the experiments conducted for the determination of antiparasitic activity, the pyrrole-containing candidates (compounds 1 to 4) stood out, as shown in Figure 1 below:

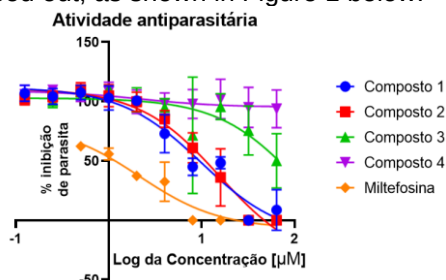


Figure 1: Antiparasitic activity graph for pyrrole-containing compounds

Notably, compounds 1 and 2, which presented IC_{50} values of 10.02 ± 0.37 and 16.03 ± 2.65 [$\mu M \pm SD$], respectively, were the closest to the reference drug (Miltefosine), which had an IC_{50} of 2.30 ± 1.02 .

On the other hand, in cytotoxicity assays, the compounds characterized by the presence of the indolizine group stood out, with most of them showing $CC_{50} > 64 \mu M$, as seen in the graphs of Figures 2 and 3:

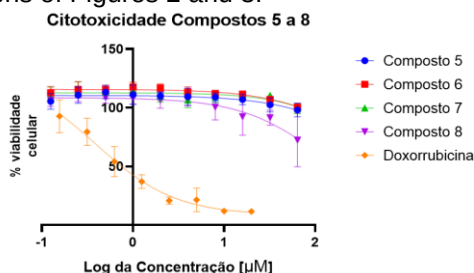


Figure 2: Cytotoxicity graph for indolizine-containing compounds (5 to 8)

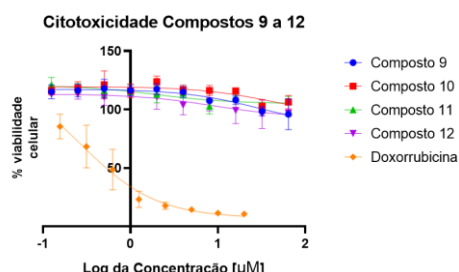


Figure 3: Cytotoxicity graph for indolizine-containing compounds (9 to 12)

As observed, the presence of indolizine promotes a much higher cell viability when compared to the reference drug (Doxorubicin), which had a CC_{50} of 0.40 ± 0.04 [$\mu M \pm SD$]. It is worth noting that pyrrole compounds 1 and 2, highlighted for their reasonable IC_{50} values, showed CC_{50} values of 18.12 ± 1.18 and 27.13 ± 1.30 , respectively, remaining above the reference drug.

Conclusions

In this scenario, it can be concluded that compounds containing the pyrrole chemical identity have some inhibitory potential, as demonstrated by candidates 1 and 2, which, although less active than the reference drug, remained close to it.

Indolizine-containing compounds, on the other hand, showed low cytotoxicity, making them an option to explore, provided good antiparasitic activity can be achieved alongside this property, which is intended to be evaluated in a follow-up project.

Overall, compounds 1 and 2 stand out from the others as they simultaneously showed reasonable inhibitory activity and lower cytotoxicity than the reference drug, and they may warrant further investigation in the continuation of the project.

Acknowledgements

The PUB (Unified Scholarship Program), and to everyone who, in their way, contributed to the completion of this project.

Referências

1. FERREIRA, L. L. G.; MORAES, J.; ANDRICOPULO, A. D. Approaches to advance drug discovery for neglected tropical diseases. *Drug Discovery Today*, [S.L.], v. 27, n. 8, p. 2278-2287, 2022.