



ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE DERIVADOS DA PORFIRINA ILUMINADOS COM LED FRENTE À *LEISHMANIA AMAZONENSIS*.

Odilon Domingues Neto (PIBIC/CNPq/UEM), Taisa Rocha Navasconi, Thais Gomes Verzignassi Silveira (Orientadora), e-mail: tgvsilveira@gmail.com.

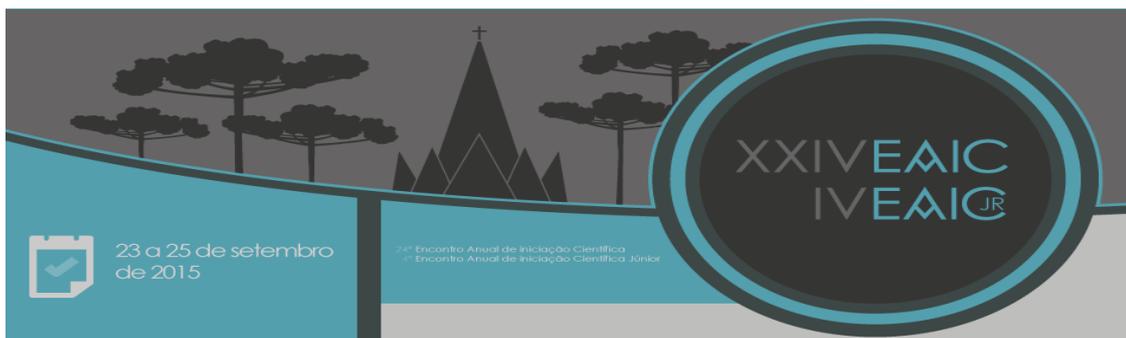
Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina / Maringá, PR.

Ciências Biológicas / Imunologia Celular.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar Americana, Terapia Fotodinâmica, Fotossensibilizadores.

Resumo:

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania* apresenta uma vasta área de transmissão nas Américas, especialmente no Brasil, representando um problema de saúde pública. O atual tratamento consiste na administração de antimoniais pentavalentes, com efeitos adversos acentuados, levando muitas vezes ao abandono do tratamento e falha terapêutica. Devido a isso, é indispensável à pesquisa por intervenções que ofereçam menos dano ao paciente e maior êxito. A terapia fotodinâmica (TFD) mostra-se uma alternativa viável ao tratamento convencional. A pesquisa em questão teve como objetivo avaliar o potencial leishmanicida de porfirinas empregadas na TFD, bem como sua toxicidade a hemácias. As porfirinas e seus derivados não apresentaram atividade leishmanicida nas concentrações e condições avaliadas, bem como não exibiram valores significativos de hemólise. A hidrofobicidade das substâncias testadas contribuiu para sua autoagregação, possivelmente limitando sua atividade fotodinâmica. Para melhor eficácia e manutenção da seletividade e disponibilidade do fotossensibilizador, uma alternativa viável é a incorporação do mesmo em lipossomos. Faz-se necessário a formulação dos fotossensibilizadores a fim de diminuir sua agregação e melhorar a sua atividade.



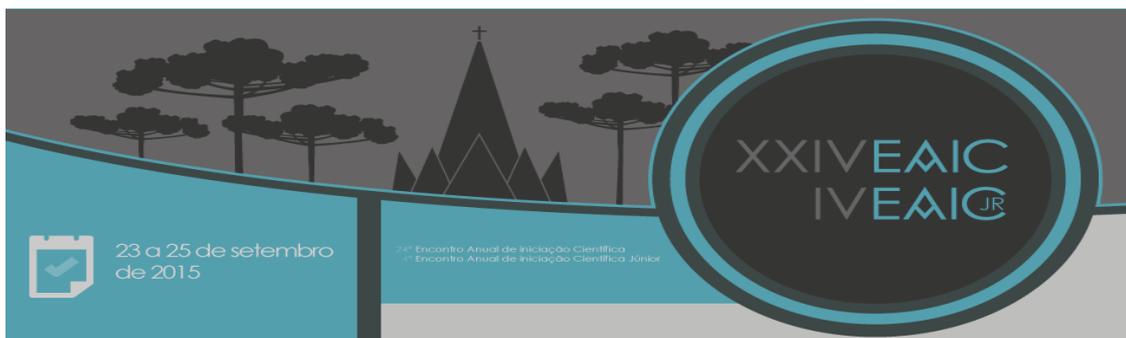
Introdução

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa cutâneo-mucosa, não contagiosa, de evolução crônica, transmitida vetorialmente pela picada de flebotomíneos fêmeas infectadas por protozoários do gênero *Leishmania* (BRASIL, 2010). A LTA representa um problema de saúde pública, afetando as Américas, Europa, África e Ásia, com registro anual de 1 a 1,5 milhões de casos. O Brasil é o país que exhibe maior área de transmissão da doença nas Américas, apresentando em média 27.608 casos de LTA por ano, sendo uma das afecções dermatológicas mais incidentes, com casos confirmados em todos os estados (BRASIL, 2010). A administração de compostos antimoniais pentavalentes corresponde ao tratamento de escolha para a LTA. Entretanto, diversos efeitos colaterais advêm de seu uso, como a ação sobre o aparelho cardiovascular, entre outros (BRASIL, 2010) (ROMERO et al., 2001). Dessa forma, faz-se necessário a busca por outras intervenções que ofereçam danos menores ao paciente, tendo êxito na cura. Nesse contexto, a Terapia Fotodinâmica (TFD) mostra-se promissora, tendo eficácia comprovada frente a protozoários da família Trypanomastidae (PIZINGER et al., 2009). A TFD causa a destruição seletiva de um tecido ou célula, por meio de uma reação fotoquímica entre um corante atóxico fotossensível (fotossensibilizador) irradiado por uma fonte de luz. O fotossensibilizador, quando ativado, transfere energia para o oxigênio molecular do tecido alvo, gerando espécies reativas de oxigênio, induzindo a morte celular (KALKA; MERK; MUKHTAR, 2000). O procedimento não apresenta efeitos tóxicos cumulativos comparados a outras terapias citotóxicas, podendo ser usado em pessoas idosas e pacientes mais debilitados.

Tendo em vista os efeitos adversos do tratamento convencional da LTA, bem como a escassez de tratamentos alternativos, é necessária a busca por novas formas de intervenção. O presente estudo avaliou a atividade leishmanicida na TFD de derivados de porfirinas (Tetrapiridilporfirina (TPYP), tetrametoxifenilporfirina (TMPP), tetrametoxifenilporfirina de zinco (TMPP Zn), tetrapiridilporfirina de zinco (TPYP Zn)), bem como seus efeitos citotóxicos a hemácias.

Materiais e métodos

Os fotossensibilizadores foram sintetizados no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá.



O cultivo de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi feito em meio RPMI 1640 com pH de 6,8 suplementado com 10% soro bovino fetal, 2mM L-glutamina, 1% urina humana estéril, 100 UI/mL de penicilina G e 100 µg/mL de sulfato de estreptomicina.

Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram colocadas em contato com diferentes concentrações dos fotossensibilizadores, os quais foram adicionados às placas de cultura de 96 poços e diluídos seriadamente na razão dois. As placas foram iluminadas com luzes de LED vermelho (630nm) e colocadas na presença e na ausência de luz por 30 minutos, e depois incubadas. Como controle negativo foram usadas promastigotas não tratadas. A avaliação e quantificação dos parasitos foram realizadas pelo método de redução do XTT. A leitura foi realizada em leitora de microplacas a 450nm.

Para o teste de hemólise, os fotossensibilizadores foram diluídos na razão dois em salina glicosada e colocados em placas de cultura de 96 poços, as quais foram adicionadas uma suspensão de hemácias. As placas foram mantidas no escuro por 30 minutos e, posteriormente, uma delas foi iluminada por 30 minutos com LED vermelho. Como controle positivo de hemólise foi usado solução a 4% de Triton X100. Como controle negativo foi usado a solução de hemácias a 6%. Após a iluminação, as placas foram mantidas a 37°C por duas horas, centrifugadas a 1100 rpm por 5 minutos e 100 µL do sobrenadante de cada poço foram transferidos para uma segunda placa para realização da leitura. A leitura foi realizada em leitora de microplacas a 450nm.

Resultados e Discussão

A porfirina TPYP teve sua concentração diluída de 384nM até 0,18nM, a TPYP Zn de 154nM até 0,07nM, a TMPP de 75µM até 0,036µM e a TMPP Zn de 210µM até 0,1µM, todas de forma seriada. As porfirinas foram analisadas em experimentos realizados em triplicata, e nenhuma das substâncias testadas exibiu valores significativos de porcentagem de morte do parasito, não apresentando atividade leishmanicida, tanto na presença quanto na ausência de luz. As porcentagens de hemólise para as respectivas porfirinas não evidenciaram valor significativo de lise das hemácias para os fotossensibilizadores em questão, salvo o controle positivo, exibindo 100% de hemólise.



Conclusões

As substâncias em questão apresentam-se agregadas quando solubilizadas devido a sua hidrofobicidade. A capacidade de autoagregação e a precipitação em meio aquoso diminuem significativamente a disponibilidade dos fotossensibilizadores no meio, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio e sua atividade fotodinâmica. Os resultados apresentados são importantes para justificar uma melhor formulação desses compostos, como a incorporação em lipossomos, a fim de aumentar a disponibilidade e distribuição dos mesmos.

Agradecimentos

À Fundação Araucária pelo financiamento do projeto, à Dra. Thais Gomes Verzignassi Silveira pela orientação e a todos do Laboratório de Imunologia Clínica da UEM pelo aprendizado.

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Brasília, DF, 2010.

KALKA K, MERK H, MUKHTAR H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, n. 42, p. 389-413, 2000.

PIZINGER K, CETKOVSKA P, KACEROVSKA D, KUMPOVA M. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy and cryotherapy. **European Journal of Dermatology**, n. 19, p.172-183, 2009.

ROMERO GA, GUERRA MV, PAES MG, MACEDO VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 65, p. 456-465, 2001.