ATIVIDADE DE DERIVADOS DE ERITROSINA INCORPORADOS EM PLURONICOS® DE P-123 NA TERAPIA FOTODINÂMICA PARA OS PROTOZOÁRIOS *Leishmania (viannia) braziliensis*

Dafne Monteiro Piovesana (PIC), Jully Oyama, Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos-Milaré, Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera-Nonose, Maria Valdrinez Campana Lonardoni, Thaís Gomes Verzignassi Silveira (Orientadora)
E-mail: tgvsilveira@gmail.com

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Dpto Análises Clínicas e Biomedicina, Maringá-PR

Palavras-chave: nanocarreadores, fotossenssibilizador, leishmaniose tegumentar

Área e subárea do conhecimento: Saúde Pública

Resumo

As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. A infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* causa a forma mucosa, que pode resultar em lesões desfigurantes e mutilantes. Para o tratamento da leishmaniose é usado o antimoniato de N-metilglucamina, por via endovenosa, fármaco que induz severos efeitos adversos e que pode levar ao abandono do tratamento pelos pacientes. Assim, é necessário o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas. A terapia fotodinâmica (TFD) é simples, econômica e não invasiva. São aplicadas substâncias fotossensíveis, as quais estimulam espécies reativas de oxigênio que são tóxicas aos parasitas. O objetivo desse projeto foi determinar a atividade de derivados de eritrosina (frações butil e decil) incorporados em plurônicos® de P-123 na TFD para formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e investigar as alterações ultraestruturais. Os formulados inibiram a taxa de sobrevivência dos parasitos e provocaram alterações em suas estruturas, o que sugere seu potencial para tratamento da leishmaniose.

Introdução

As leishmanioses estão entre as doenças mais negligenciadas do mundo (1). São causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas através da picada de insetos flebotomíneos (1). O tratamento da leishmaniose apresenta limitações como a alta toxicidade e a resistência do parasito às drogas, resultando em baixa adesão ao tratamento. A TFD tem sido estudada como uma alternativa, e os resultados são promissores. A TFD consiste no uso de substâncias fotossensíveis (SF) que são liberadas no tecido alvo, estimulando a produção de intermediários reativos de oxigênio e outros, que danificam os patógenos sem causar danos a outros tecidos (5). A eritrosina é um corante xantênico interessante como fotossensibilizador para a TFD, mas sua hidrofobicidade diminui a afinidade por membranas. A sua incorporação em nanocarreadores como os copolímeros de

tribloco Plutônicos®, evita a agregação em água, permite a entrega eficiente dos fármacos nos tecidos-alvo e diminui a toxicidade sistêmica. Este estudo teve como objetivo determinar a atividade de derivados de eritrosina incorporados em plutônicos® de P-123 sobre formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* na terapia fotodinâmica.

Materiais e métodos

Cultura e manutenção de Leishmania: formas promastigotas de *L. braziliensis* foram mantidas por repiques semanais em meio de cultura 199 suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal e cultivadas a 25ºC.

Derivados de eritrosina: foram estudadas as frações butil e decil, incorporadas em pluronico® P-123 (ERIBUT-P123 e ERIDEC-P123, respectivamente).

Atividade mitocondrial: suspensão contendo $4x10^7$ parasitos/mL foi distribuída em microplaca de 96 poços e diferentes concentrações de ERIBUT-123 e ERIDEC-P123 foram acrescentadas. Após 24 horas a 25°C, as microplacas (com e sem luz) foram centrifugadas e 100 µL do sobrenadante de cada poço removido. A seguir foram adicionados 100 µL de XTT (500 mg/mL) ativado com PMS (50 mg/mL), seguido de incubação por 3 horas a 37°C. A porcentagem de inibição da atividade mitocondrial foi estimada por comparação com as culturas controles não tratadas. Os experimentos foram realizados em triplicata e repetidos quatro vezes.

Microscopia para visualização das alterações morfológicas: formas promastigotas foram tratadas com ERIBUT-P123 e ERIDEC-P123. Após, foram centrifugadas e lavadas com solução salina tamponada com fosfato pH 7,2 e em seguida fixadas com formalina a 2% em lâmina de microscopia e coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). As preparações foram observadas ao microscópio de fluorescência EVOS FL numa amplificação de 40x.

Morfologia celular: para observar as possíveis alterações na morfologia celular induzidos por ERIBUT-P123 e ERIDEC-P123, $4x10^7$ promastigotas/mL *de L. (V.) braziliensis* foram incubadas por 0h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 72h com a concentração mais ativa das dos fármacos. Culturas não tratadas foram usadas como controle. As observações e análises foram feitas ao microscópio de fluorescência EVOS FL e com o microscópio invertido.

Resultados e Discussão

ERIBUT-P123 e ERIDEC-P123 inibiram significativamente a taxa de sobrevivência de promastigotas de *L. braziliensis*. A maior inibição foi de 72,33% para ERIBUT-P123 e 84,46% para ERIDEC-P123 na presença de luz. Na ausência de luz, os resultados foram semelhantes (Tabela 1). Estes compostos induziram alterações morfológicas em promastigotas que podem ser observadas à microscopia óptica (Figura 1 e 2).

Tabela 1 – Percentual de mortalidade de *L. (V.) braziliensis* após tratamento com ERIBUT-P23 ou ERIDEC-P123 na presença ou ausência de luz

Derivados (Mol/L)	Presença de luz		Ausência de luz	
	ERIBUT-P123	ERIDEC-P123	ERIBUT-P123	ERIDEC-P123
$3x10^{-5}$	56,28	72,57	45,58	83,19
$1,5x10^{-5}$	60,46	79,78	43,32	74,91
$7,5x10^{-6}$	60,59	63,66	52,56	53,2
$3,75x10^{-6}$	57,22	86,46	56,46	82,18
$1,9x10^{-6}$	72,33	84,86	59,34	73,27

Promastigotas de *L.(V.) braziliensis* foram cultivadas na presença ou na ausência de luz, com diferentes concentrações de ERIBUT-P123 ou de ERIDEC-P123 e a mortalidade foi avaliada pelo ensaio com XTT. ERIBUTI-P123: fração butil de eritrosina incorporada em pluronico® P-123; ERIDEC-P123: fração decil de eritrosina incorporada em pluronico® P-123.

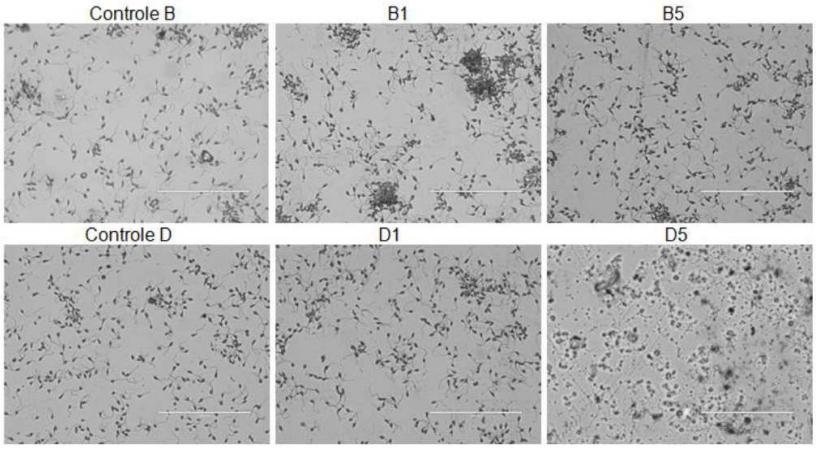

Figura 1- Alterações estruturais em *L. (V.) braziliensis* tratadas com ERIBUT-P123 (B) e ERIDEC-P123 (D) em maior concentração (B1, D1) e menor concentração (B5, D5) com luz. Controles: parasitos não tratados.

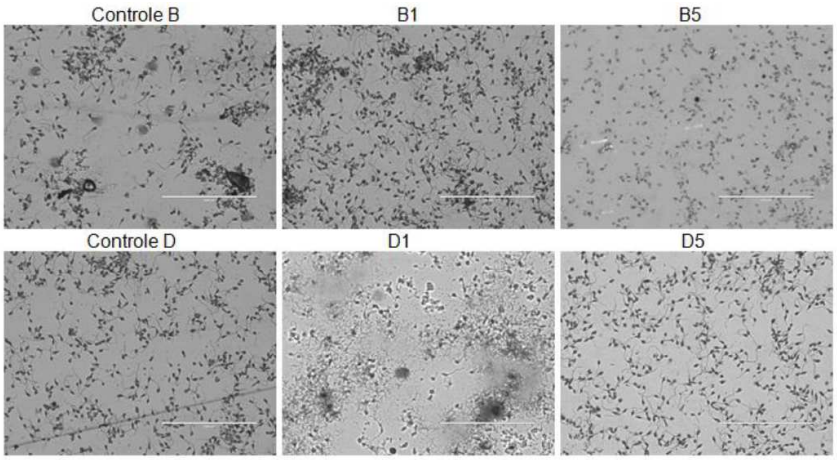

Figura 2 - Alterações estruturais das *L. braziliensis* tratadas com ERIBUT-P123 (B) e ERIDEC-P123 (D) em maior concentração (B1, D1) e menor concentração (B5, D5) sem luz. Controles: parasitos não tratados.

Conclusões

Os estudos com as preparações das frações de eritrosina em plurônicos, ERIBUT-P123 e ERIDEC-P123, sugerem que estes fármacos são promissores, pois eles induziram percentuais elevados de mortalidade em promastigotas de *L. (V.) braziliensis*. A análise das alterações celulares induzidas nos parasitos indica que estes compostos determinam danos que comprometem a viabilidade de formas promastigotas. No entanto, estes efeitos parecem não ser dependentes da TFD, uma vez que os resultados na presença e ausência de luz são similares. Novos estudos devem ser realizados para a avaliação da atividade destes fármacos sobre formas amastigotas intracelulares e em modelos experimentais de infecção por *Leishmania*.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação Araucária e Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos (NUPESF).

Referências

1.World Health Organization. Leishmaniasis/Fact sheet. April. 2017. Available from: **http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/**

2. Navasconi, T. R.; dos Reis, V. N.; Freitas, C. F.; de Souza Pereira, P. C.; Caetano, W.; Hioka, N.; Lonardoni, M. V. C.; Aristides, S. M. A.; Silveira, T. G. V. Photodynamic therapy with Bengal Rose and derivatives against Leishmania amazonensis. **Journal of lasers in medical sciences**, v. 8, n. 1, p. 46, 2017.

3. Nesi-Reis, V.; Navasconi, T. R.; Lera-Nosone, D. S. S. L.; Oliveira, E. L.; Barbosa, P. M.; Caetano, W.; Silveira, T. G. V.; Aristides, S. M. A.; Hioka, N.; Lonardoni, M. V. C. Phototoxic effect of aluminium-chlorine and aluminium-hydroxide phthalocyanines on Leishmania (l.) amazonensis. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 21, p. 239-245, 2018.

4. Oliveira, L. F.; Schubach, A. O.; Martins, M. M.; Passos, S. L.; Oliveira, R. V.; Marzochi, M. C.; Andrad, C. A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, vol. 118, n. 2, p. 87-96, 2011.

5. Kataoka, K.; Harada, A.; Nagasaki, Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced drug delivery reviews**, v. 64, p. 37-48, 2012.