

AVALIAÇÃO DO EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM HIPERICINA SOBRE *LEISHMANIA (LEISHMANIA) AMAZONENSIS*

Larissa Ferreira de Oliveira (PIBIC/Uem), Katieli da Silva Souza Campanholi, Prof. Dr. Wilker Caetano, Prof. Dr. Paulo Cesar Souza Pereira, Prof^a. Dr^a. Maria Valdrinez Campana Lonardoní, Prof^a. Dr^a. Sandra Mara Alessi Aristides. E-mail: smaaristides@uem.br

Universidade Estadual de Maringá / Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área: Farmácia. **Subárea do conhecimento:** Análise e Controle de Medicamentos

Palavras-chave: *Leishmania*, leishmaniose, fototerapia, fotossensibilizador.

Formatado: Fonte: Itálico

Resumo:

Leishmanioses são doenças endêmicas causadas por ~~parasitas~~ parasitos do gênero *Leishmania* que infecta macrófagos na forma amastigota gerando cerca de 2 milhões de novos casos anuais. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LLA) é um dos agentes da leishmaniose tegumentar (LT). A busca por novos fármacos para o tratamento da LT é essencial devido a toxicidade e elevada ineficácia dos utilizados atualmente e a terapia fotodinâmica (TFD), tem se mostrado um candidato promissor. A TFD baseia-se no uso de um fotossensibilizador (PS) que exposto a luz e oxigênio estimula a produção de espécies reativas de oxigênio e destruição celular. Neste projeto foi realizado uma avaliação do efeito da ftalocianina alumínio-cloro (AIPcCl) como PS em formas amastigotas de LLA sob irradiância de luz vermelha (5,45 mW/cm²). Foi observado que este fármaco sozinho ou com irradiação não mostrou efeito tóxico para os macrófagos J774.A1. O IC50 para as formas amastigotas foi de 5,21nM para a placa iluminada. A AIPcCl mostrou-se um agente fotossensibilizador eficiente, sendo capaz de reduzir a infecção de macrófagos por formas amastigotas de *L. (L.) amazonensis* em baixas concentrações.

Introdução

Negligenciadas e endêmicas as leishmanioses são doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* cujo vetor são fêmeas de mosquitos flebotomíneos. A parasitose afeta mais de 80 países causando aproximadamente dois milhões de novos casos todos os anos. Dentre os subtipos clínicos o mais recorrente é a leishmaniose tegumentar (LT) que causa úlceras na pele e enquadra-se entre as seis principais doenças infecciosas pela OMS, sendo a *Leishmania (Leishmania)*

amazonensis uma das três principais espécies recorrentes no América. (BRASIL, 2017).

Após atingir o hospedeiro humano o protozoário muda da forma infectante e flagelada *promastigota*, para a forma *amastigota*, que se prolifera em macrófagos, células de defesa teciduais. O tratamento atual é baseado no uso dos antiomoniais pentavalentes (Glucantime®), pentamidinas, anfotericina B e mitelfosina, que possuem alta toxicidade e baixa eficácia, portanto é necessária a busca por novos fármacos. (BRASIL, 2017).

Estudos com terapia fotodinâmica (TFD) mostram que este pode ser um tratamento relevante para leishmanioses e outras patologias. A TFD consiste no uso de fotossensibilizadores (PS), luz e presença de oxigênio atmosférico (O₂) para gerar espécies reativas de oxigênio (ERO) que causam morte celular por apoptose. É um método fotoquímico que depende da exposição do PS a um comprimento de onda adequado que causa uma destruição seletiva do alvo, diminuindo efeitos colaterais. (SBEGHEN *et al.*, 2015; DUTTA *et al.*, 2013; NESI-REIS *et al.*, 2018). Portanto, dado a ineficácia e a toxicidade da terapêutica atual e os resultados promissores da TFD, o objetivo desse estudo foi avaliar o efeito da ftalocianina como PS contra formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

Materiais e métodos

Obtenção do composto teste e fonte de luz

O composto analisado foi o fotossensibilizador ftalocianina de alumínio-cloro (AlPcCl), obtido no laboratório NUPESF (Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos e Nanomedicina) da Universidade Estadual de Maringá (UEM/PR), fornecido pelo Prof. Dr. Wilker Caetano. O fármaco foi diluído em DMSO para obter uma concentração estoque de 450 μ M. Foi armazenado protegido da luminosidade.

A fonte de luz corresponde a um dispositivo de LED com incidência de luz por uma fonte de diodo emissor na região do vermelho do espectro eletromagnético (Irradiância de 5,45 mW/cm²).

Ensaio em amastigotas LLA

Os macrófagos imortalizados da linhagem J77.A1 foram mantidos em meio RPMI 1640 suplementado com 20% de soro bovino fetal, pH 7,6 e enriquecidos com antibióticos. Para o experimento 170 μ L de uma suspensão contendo 3×10^6 macrófagos/mL, foram distribuídos em duas placas de 24 poços, sobre laminulas de vidro e incubadas por 2 horas a 37 °C com 5 % de CO₂. Em seguida 500 μ L de uma suspensão contendo $3 \cdot 10^7$ promastigotas/mL de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016) em meio RPMI foram adicionados às culturas de macrófagos. As placas foram incubadas a 37 °C com atmosfera contendo 5-% de CO₂ por 4 horas para a infecção conversão em amastigotas. Após isso foram adicionados 300 μ L de três concentrações, em triplicatas (5 μ M, 2,5 μ M e 1,25 μ M) de AlPcCl,

poços sem drogas foram utilizados como controle. As placas foram incubadas por 3 horas a 37 °C 5-% de CO₂ e em seguida apenas uma delas foi irradiada com a luz LED de 5,45 mW/cm² por 30 minutos. Ambas foram incubadas novamente após essa etapa por 24 horas. As lamínulas foram removidas, lavadas e coradas com Panótico Rápido (Gimsa) e fixadas em lâminas de vidro com Entellan. O número de amastigotas intracelulares foi determinado pela contagem de pelo menos 200 macrófagos. O índice de infecção (IF) foi calculado pela multiplicação da porcentagem de macrófagos infectados pelo número médio de ~~parasitas~~ parasitos por macrófagos. Também foram definidas as concentrações inibitórias 50% (IC50) por regressão polinomial e o índice de seletividade (IS) calculado por CC50/IC50.

Resultados e Discussão

A ftalocianina alumínio-cloro não apresentou atividade citotóxica significativa contra os macrófagos J744.A1. Tanto as placas iluminadas quanto as não iluminadas, não mostraram alterações morfológicas de núcleo ou citoplasma indicando que a AIPcCl não é tóxica para essas células, o que condiz com outros estudos (NESI-REIS *et al*, 2018; DUTTA *et al.*, 2005) que alcançaram os mesmos resultados desse fármaco com a linhagem J774.A1 de macrófagos.

O efeito das três concentrações do fármaco com e sem exposição ~~á~~ à luz em *Leishmania L. amazonensis* estão demonstrados na Tabela 1. O valor de IC50 encontrado foi de 5,21 nM de AIPcCl e o IS de 0,34 µM para a placa irradiada, sendo o valor de CC50 obtido do ensaio de NESI-REIS *et.al*, 2018. Não houve diferença significativa entre os IC50 das culturas iluminadas ou não. Estudo realizado por NESI-REIS *et al.*, 2018 obteve IC50 de 0,21 µM para forma promastigotas de LLA. No presente estudo encontramos que para formas amastigotas intracelulares o IC50 foi 40,3 vezes menor que para promastigotas. Resultados semelhantes foram obtidos por DUTTA (2005), que mostrou que a AIPcCl, quando exposta à luz vermelha induz morte rápida dos ~~parasitas~~ parasitos.

Tabela 1. Ação da ftalocianina-alumínio-cloro (AIPcCl) sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos murinos J774.A1.

[AIPcCl]	Com luz			Sem luz		
	aa/Mø*	% infecção	Índice de infecção	aa/Mø	% infecção	Índice de infecção
5 nM	4,07	79	3,22	4,6	79,5	3,66
2,5 nM	5,83	88,7	5,18	4,4	91	4
1,25 nM	5,93	90	5,34	5,7	91	5,22
Controles	6,42	89	5,71	6,38	90	5,74

* Número de formas amastigotas por macrófago; Mø: macrófagos.

Conclusões

Os resultados demonstraram que a ftalocianina alumínio-cloro AIPcCl tem efeito leishmanicida, e não apresenta toxicidade celular. No entanto mais estudos devem ser realizados para confirmar estes resultados.

Formatado: Justificado

Agradecimentos

Agradeço a Universidade Estadual de Maringá, órgão de fomento do projeto.

Referências

BRASIL, 2017a. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde**, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana – Editora do Ministério da Saúde, p.12: 29-30, 2017.

DUTTA, S; RAY, D; KOLLI, B.K; CHANG, K.P. Photodynamic Sensitization of *Leishmania amazonensis* in both Extracellular and Intracellular Stages with Aluminum Phthalocyanine Chloride for Photolysis In Vitro. **Antimicrob Agents Chemother**, 2005.

Formatado: Justificado

DUTTA S; WAKI K; CHANG K.C. Combinational Sensitization of *Leishmania* with Uroporphyrin and Aluminum Phthalocyanine Synergistically Enhances their Photodynamic Inactivation *in vitro* and *in vivo*. **Photochemical and Photobiology**, v.88 n. 3, 2013.

Formatado: Fonte: Itálico

NESI-REIS, V; *et al.* Phototoxic effect of aluminium-chlorine and aluminium-hydroxide phthalocyanines on *Leishmania (L.) amazonensis*. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v.2, p.239-245, mar 2018.

Formatado: Justificado

SBEGHEN M.R; VOLTARELLI E.M; CAMPOIS TG, *et al.* Eficácia tópica e intradérmica da terapia fotodinâmica com azul de metileno e diodos emissores de luz no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis*. **J Lasers Med Sci**, 2015.