

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

Larissa Ferreira de Oliveira (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Daniele Stefanie Sara Lopes Lera Nonose, Maria Valdrinez Campana Lonardoni (Orientador), e-mail: mvclonardoni@gmail.com.

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

Área: Saúde Coletiva. **Subárea do conhecimento:** Saúde Pública

Palavras-chave: Leishmania, leishmaniose tegumentar, fotossensibilizador

Resumo

As leishmanioses são parasitoses endêmicas que afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Uma das formas clínicas mais frequentes da doença é a leishmaniose tegumentar, que causa lesões na pele e mucosa, sendo a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* uma das principais espécies associadas a essa patologia. Devido a toxicidade e ineficácia dos fármacos atuais, pesquisas por novas formas de tratamento para esta doença são imprescindíveis e a terapia fotodinâmica com hipericina mostra-se uma alternativa promissora. Neste ensaio foi avaliada a terapia fotodinâmica utilizando a hipericina livre e uma formulação contendo hipericina encapsulada em plurônico F-127 sob formas promastigotas de *L. amazonensis*. Também foram realizados ensaios para otimizar esses experimentos. Os valores da concentração inibitória para 50% dos parasitos (CI₅₀) para a hipericina e para o formulado foram de 18,87 µM e 14,88 µM, respectivamente. Os resultados indicam efeito leishmanicida destes fármacos, com perspectivas de novos estudos visando seu uso.

Introdução

Leishmanioses são doenças endêmicas tropicais e subtropicais que assolam dezenas de países pelo mundo. Os agentes etiológicos são protozoários do gênero *Leishmania* e os vetores são flebotomíneos fêmeas que transmitem as formas promastigotas infectantes e flageladas desse parasito. Após a infecção esses microrganismos são fagocitados por macrófagos teciduais e neles se convertem em amastigotas, formas aflageladas. A leishmaniose tegumentar (LT) afeta a pele e mucosas, causando lesões ulcerosas únicas ou múltiplas. A *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é uma das espécies causadoras da LT e pode evoluir para a forma disseminada da doença, que embora seja rara, é grave. Atualmente o tratamento da LT baseia-se no uso dos antimonial pentavalentes (Glucantime[®]) e outras drogas como a anfotericina B e pentamidinas. Esses fármacos tem elevada toxicidade com

efeitos colaterais severos, bem como altas taxas de recidivas e de ineficácia (BRASIL, 2017).

A terapia fotodinâmica é uma técnica fotoquímica, fundamentada na exposição de um fotossensibilizador (FS) a uma fonte de luz, resultando na sua ativação e formação de espécies reativas de oxigênio, que causam destruição seletiva da célula alvo. Essa metodologia é amplamente aplicada em dermatologia e é efetiva contra microrganismos, inclusive em tratamentos de lesões cutâneas de leishmaniose (NESI-REIS et al., 2018) Dentre os fotossensibilizadores conhecidos, a hipericina, um derivado da antraquinona, mostra-se promissora, com efeito antitumoral, antimicrobiano e leishmanicida (SINGH et al., 2015). Sua conformação altamente hidrofóbica pode gerar autoagregação às membranas celulares e o encapsulamento em plurônicos, como o F-127, pode ser uma alternativa para solucionar esse problema (DE FREITAS et al., 2016). O objetivo desse projeto é estudar a ação da hipericina e do formulado de hipericina encapsulada em F-127 sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* empregando a terapia fotodinâmica.

Materiais e métodos

Obtenção do composto teste e fonte de luz

Os compostos utilizados foram o FS hipericina e um formulado contendo hipericina encapsulada no plurônico F-127 (0,5% m/v). Os compostos foram fornecidos pelo professor Dr. Renato Sonchini Gonçalves do laboratório NUPESF (Núcleo de Pesquisa em Sistemas Fotodinâmicos e Nanomedicina) do Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá (UEM/PR). A hipericina foi diluída em DMSO (sulfóxido dimetílico) e o formulado em meio de cultura RPMI pH 6,8.

Ensaio sobre formas promastigotas de Leishmania (L.) amazonensis

A partir de culturas de promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016) foram preparadas suspensões contendo 4×10^7 promastigotas/mL que foram adicionadas sobre duas placas de cultura de 96 poços. Tanto o formulado quanto a hipericina foram diluídos em meio de cultura RPMI pH 6,8 nas seguintes concentrações: 50 μ M; 25 μ M; 12,5 μ M; 6,25 μ M; 3,125 μ M; 1,562 μ M e 0,781 μ M. As formas promastigotas foram tratadas com estas diferentes concentrações dos fotossensibilizadores, sendo uma das placas incubada por 30 minutos em seguida iluminada por fonte de luz LED branca a uma distância de 5 cm, enquanto a outra foi mantida protegida da luz. Em seguida ambas as placas foram incubadas por 24 horas e os resultados avaliados com o reagente XTT [2,3-bis (2-metoxi 4-nitro-5-sulfofenil) -2H-tetrazólio-5-carboxanilida] (Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA), que é metabolizado apenas em mitocôndrias de leishmanias vivas. Os resultados foram analisados por espectrofotometria. Controles de turbidez

também foram realizados seguindo a mesma metodologia, sem a adição de promastigotas.

*Otimização do ensaio sobre formas promastigotas de *L. amazonensis**

Utilizando a mesma metodologia, experimentos sobre formas promastigota com concentrações selecionadas de 12,5 μM e 1,562 μM em diferentes condições de experimentação foram realizados, alterando o tempo de incubação com a droga antes da iluminação de 30 minutos para 1 hora e para 3 horas, e mudando a aproximação da fonte de luz de 5 centímetros para 3 centímetros e para 1 centímetro.

Análise estatística

Foram calculadas as CI_{50} (concentração inibitória para 50% dos parasitas) dos fotossensibilizadores utilizando regressão polinomial de grau 2.

Resultados e Discussão

Os valores de CI_{50} encontrados para a hipericina e formulado expostos à luz foram 18,87 μM e 14,88 μM , respectivamente. As substâncias não manifestaram atividade leishmanicida significativa quando não iluminadas por LED, não sendo possível calcular valores de CI_{50} . De forma antagônica o trabalho de SINGHS *et. al.*, encontrou um CI_{50} de 18 μM para a hipericina sem iluminação contra formas promastigotas de *Leishmania donovani*, valor semelhante ao encontrado nesse ensaio para esse fotossensibilizador somente após a iluminação.

Os resultados indicam que os efeitos da hipericina na inibição do crescimento de promastigotas de *L. amazonensis*, tanto isoladamente como encapsulada no plurônico F-127, são semelhantes entre si, apresentando valores de CI_{50} próximos. Dada a grande facilidade de agregação da hipericina, acredita-se que a sua formulação com o plurônico F-127 possa garantir maior estabilidade à preparação e garantir a entrega do fármaco. Isso será investigado em futuros estudos “*in vivo*”.

Objetivando otimizar os resultados encontrados e potencializar a promissora atividade antiparasitária do fotossensibilizador, experimentos com diferentes condições de tempo de incubação e distância da luz foram realizados. Para isso foram estudadas as concentrações 12,5 μM e 1,562 μM de hipericina.

O melhor percentual de inibição dos parasitos foi com 5 cm de distância da fonte de luz e 3 horas de incubação com o FS, resultando em 72% e 65% de morte dos parasitos, para concentrações de 12,5 μM e 1,562 μM de hipericina e 76% e 43% para as mesmas concentrações do formulado, respectivamente. Esses resultados são concordantes com os obtidos nos trabalhos de NESI-REIS *et. al.* (2018) e CRUZ (2017), que utilizaram a mesma metodologia deste ensaio de otimização testando ftalocianinas como FS em promastigotas de *L. amazonensis*. No primeiro trabalho o tempo de incubação das drogas antes da iluminação foi de 30 minutos, já no segundo

o tempo de incubação, elevado para 3 horas, houve uma significativa redução dos valores de CI_{50} , com aumento na porcentagem de inibição dos parasitos, sugerindo que maiores tempos para interiorização das substâncias fotossensíveis antes da iluminação são favoráveis para promover o efeito leishmanicida, como observado neste trabalho.

Conclusões

As substâncias fotossensibilizadoras hipericina livre e encapsulada com o plurônico F-127 mostraram efeitos semelhantes na indução da atividade antiparasitária contra formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, sugerindo que a hipericina é promissora como substituto para a terapêutica atual para a LT.

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, v. 12, p. 29-30, 2017

CRUZ, D.C. Atividade da terapia fotodinâmica com ftalocianinas sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Unicesumar - Centro Universitário de Maringá - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Trabalho de conclusão do curso de graduação em biomedicina, 2017.

DE FREITAS, C.F.; PELLOSI, D.S.; ESTEVÃO, B.M.; CALORI, I.R.; TSUBONE, T.M.; POLITI, M.J.; CAETANO, W.; HIOKA, N. Nanostructured polymeric micelles carrying xanthene dyes for photodynamic evaluation. **Photochem. Photobiol.**, v. 92, p. 790–799, 2016.

NESI-REIS, V.; NAVASCONI, T.R., LERA-NONOSE, 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*. **Photodiagnosi**, v. 21, p. 239-245, 2018.

SINGH, SHALINI et al. Probing the molecular mechanism of hypericin-induced parasite death provides insight into the role of spermidine beyond redox metabolism in *Leishmania donovani*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 15-24, 2015.