

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE SUBSTÂNCIAS FOTOSSENSÍVEIS INCORPORADAS EM PLURÔNICOS® DE P123 PARA *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* NA TERAPIA FOTODINÂMICA

Caroline Franco Domingues da Silva (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Jully Oyama Takizawa, Maria Valdrinez Campana Lonardoni, Jorge Juarez Vieira Teixeira (Orientador), e-mail: jjvteixeira@gmail.com.

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

Saúde Coletiva e Saúde Pública

Palavras-chave: eritrosinas, nanocarreadores, terapia fotodinâmica

Resumo

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa não contagiosa causada por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitida por flebotomíneos fêmea do gênero *Lutzomyia*. Os fármacos disponíveis para o tratamento apresentam limitações devido a toxicidade e administração endovenosa diária por um longo período. Estes fatores levam a falha terapêutica e baixa adesão ao tratamento. Também pode ocorrer resistência dos parasitos aos fármacos. Novas modalidades de tratamento são necessárias e entre elas a terapia fotodinâmica (TFD) é estudada por ser uma técnica simples, não invasiva, seletiva para a região de interesse e de baixo custo. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade de substâncias fotossensíveis como os derivados da eritrosina, ésteres butil (ERIBUT) e decil (ERIDEC) incorporados em micelas de Pluronicos® P123, usando a TFD em *Leishmania braziliensis*. A determinação do potencial de membrana mitocondrial indicou despolarização destas estruturas em formas promastigotas, além de alterações morfológicas importantes. Conclui-se que a TFD é uma modalidade terapêutica promissora para o tratamento da LT, e novos estudos devem ser conduzidos para avaliar seu potencial no tratamento da doença.

Introdução

A LT é uma doença parasitária transmitida pela picada de insetos flebotomíneos fêmea do gênero *Lutzomyia*, que quando infectados, inoculam nos hospedeiros os parasitos, durante o repasto sanguíneo. A LT se caracteriza por pequenas feridas arredondadas na pele e com borda elevada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). No Sistema Único de Saúde (SUS) a opção para o tratamento é o antimonialato de meglumina que é um fármaco de alta toxicidade e que gera muitos efeitos adversos. A administração endovenosa por longos períodos leva muitos pacientes a abandonar o tratamento, resultando em resistência dos parasitos (PONTE-SUCRE et al., 2017). Por isso se faz necessária a pesquisa de novas terapias.

A terapia fotodinâmica (TFD) não é invasiva, é seletiva para a região de interesse e apresenta baixo custo, consistindo na ativação de um fotossensibilizador (SF) com luz, que na presença de oxigênio molecular gera espécies reativas de oxigênio, que

são citotóxicos e geram estresse oxidativo, com a morte dos patógenos (IBANEZ et al, 2002). Os derivados da eritrosina, ésteres butil (ERIBUT) e decil (ERIDEC), são hidrofóbicos e a sua incorporação em sistemas de “*drug delivery system*” evita a agregação em água e auxilia a liberação no tecido-alvo. Um desses sistemas de entrega de fármacos são as micelas poliméricas tribloco, os Plurônicos® de P123 (OYAMA et al., 2019). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-*L. braziliensis* da ERIBUT e ERIDEC incorporados em Plurônicos® de P123 na TFD.

Materiais e métodos

Cultura e manutenção de Leishmania

L. braziliensis foi cultivada em meio de cultura 199 (Gibco®), suplementado com 10% de soro bovino fetal e antibióticos. As culturas foram incubadas a 25°C e mantidas por passagens semanais.

Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Formas promastigotas de *L. braziliensis* (4×10^7 parasitos/mL) foram tratadas com P123 sozinho (13,7 mM) e ERIBUT e ERIDEC (30 μ M) incorporados em P123 (ERIBUT-P123 e ERIDEC-P123) durante 24 h a 25°C. Após, os parasitas foram lavados com solução salina tamponada (PBS) e incubados com 5 μ g/mL de rodamina 123 (Rh123) por 15 min. A seguir foram lavados e suspensos em PBS e incubados por mais 30 min. A determinação do $\Delta\Psi_m$ foi realizada em citômetro de fluxo BD FACSCalibur™ (Becton Dickinson, Rutherford, NJ, EUA) e o software CellQuest Pro (Joseph Trotter, Instituto de Pesquisa Scripps, La Jolla, CA, EUA), com 10.000 eventos adquiridos usando o canal FITC. A porcentagem de fluorescência, a qual permite quantificar mudanças na intensidade de fluorescência da Rh123, foi determinada pela equação $(MT/MC) \times 100$, sendo MT a fluorescência média dos parasitas tratados e o MC a fluorescência média dos controles negativos. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2 2 mM, Tedia, Fairfield, EUA) foi usado como controle positivo. Controle negativo foram promastigotas não tratadas e o Plurônicos®P123 sem incorporação de corante também foi avaliado. O $\Delta\Psi_m$ foi determinado pela porcentagem de fluorescência emitida pelos parasitas. Quanto menor a porcentagem de fluorescência mais mitocôndrias foram mais afetadas, pois quando os parasitos estão saudáveis as mitocôndrias retêm a Rh123 emitindo maior fluorescência.

Análise morfológica

Após os tratamentos, alíquotas de 20 μ L de promastigotas foram espalhadas sobre lâminas de microscopia e secas ao ar a 22°C. Os parasitos foram corados com May-Grünwald Giemsa. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente e deixadas secar. As análises foram realizadas em microscópio óptico (Olympus CX21) com aumento de 1000x.

Resultados e Discussão

Histogramas representativos (Figura 1 - A e B) e a representação gráfica (Figura 1 - C e D) da porcentagem de intensidade de fluorescência referente ao NC, PC e dos diferentes grupos de tratamento são mostradas na figura 1. São mostrados os parasitos tratados com 13,7 mM de Plurônicos® P123 sozinho, 30 µM de ERIBUT-P123 e 30 µM de ERIDEC-P123 no escuro (Figura 1A) e na TFD (Figura 1B).

Foram observadas mudanças no $\Delta\Psi_m$ em todos os grupos tratados quando comparados ao controle negativo. Os parasitos tratados com P123 apresentaram despolarização na TFD. A porcentagem de fluorescência na TFD para P123 sozinho foi de 39,45%, do ERIBUT-P123 foi de 33,82% e de ERIDEC-P123 foi de 30,57%. Isso demonstra que o tratamento afetou as mitocôndrias de *L. braziliensis*. No escuro, as porcentagens de fluorescência foram de 91,50% para P123 sozinho, de 83,09% para ERIBUT-123 e de 80,93% para ERIDEC-P123. Estes resultados mostraram a importância da luz na indução de danos às mitocôndrias dos parasitos.

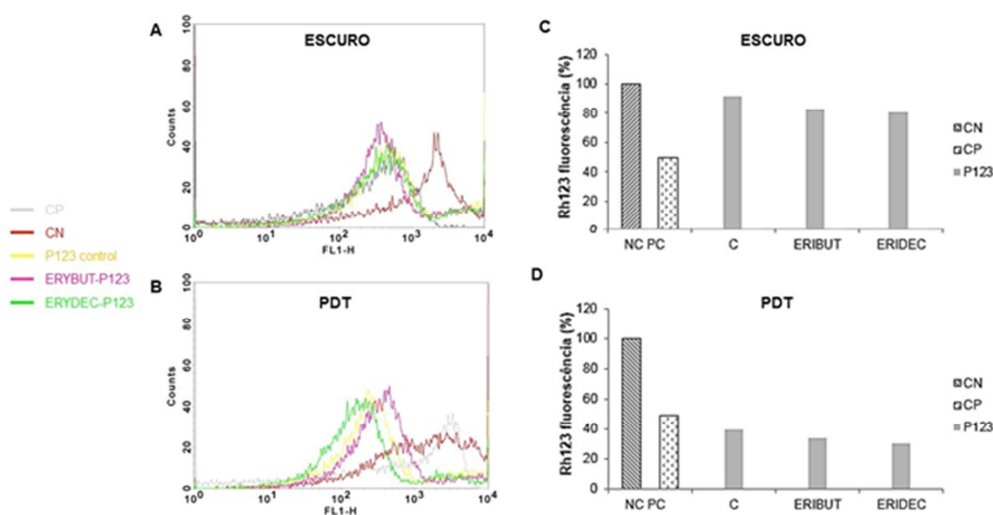


Figura 1 – Potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de *L. braziliensis* no grupo controle negativo e positivo, e tratadas com ERIBUT-P123 e ERIDEC-P123 na TFD e no escuro.

Mudanças na morfologia das formas promastigotas de *L. braziliensis* foram observadas (Figura 2). Promastigotas são células fusiformes com núcleo e cinetoplasto evidentes, além de um longo flagelo. O grupo controle não tratado e sem luz (Figura 2A) e grupo tratado apenas com LED (Figura 2E) não mostraram alterações morfológicas. Já os grupos incubados apenas com P123, com e sem luz (Figura 2B e F, respectivamente), se mostraram arredondadas. As mudanças mais evidentes foram observadas nos grupos tratados com 30 µM ERIBUT-P123, com e sem luz, (Figura 2C e G, respectivamente) e ERIDEC-P123, com e sem luz, (Figura 2D e H, respectivamente), pois grande parte dos parasitos mostram formas arredondadas e condensação nuclear.

Pinto et al. (2017) observaram alterações morfológicas em *L. braziliensis* nos grupos tratados com TFD, que mostravam perda da forma fusiforme para a forma arredondada, fragmentação e nem sempre foi possível observar núcleo, cinetoplasto e flagelo, enquanto nos grupos não tratados não houveram alterações. Também foram observadas alterações na atividade mitocondrial dos parasitos, com menor atividade mitocondrial quando comparados aos não tratados.

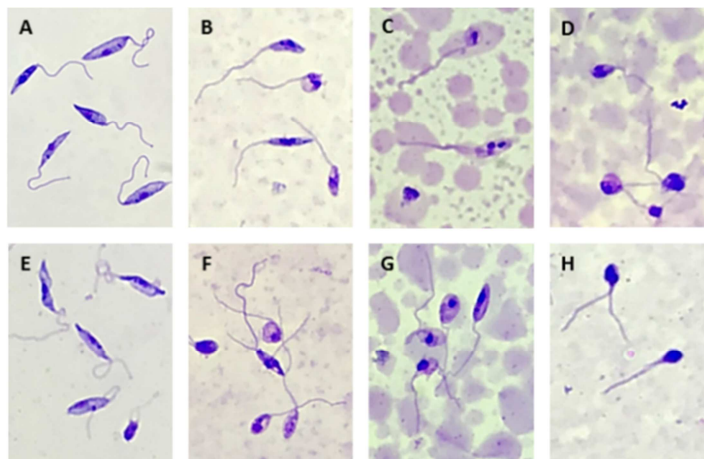


Figura 2 – Morfologia de *L. braziliensis* tratadas com ERIBUT-P123 e ERIDEC-P123 com e sem luz.

Conclusões

ERIBUT e ERIDEC incorporados em Plurônicos® de P123 usando a TFD apresentaram atividade anti-*Leishmania braziliensis*. Portanto se mostram como compostos promissores para novas possibilidades terapêuticas para a LT.

Agradecimentos

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), ao Laboratório de Imunologia Clínica e a Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Referências

IBANEZ SIMPLICIO, F.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Photodynamic therapy: Pharmacological aspects, applications and news from medications development.

Química Nova, v. 25, n. 5, p. 801–807, 2002.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l: s.n.].

OYAMA, J. et al. Potential of Pluronic® P-123 and F-127 as nanocarriers of anti-*Leishmania* chemotherapy. **Acta Tropica**, v. 192, p. 11–21, 2019.

PINTO, J. G. et al. Evaluation of methylene blue as photosensitizer in promastigotes of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 325–330, 2017.

PONTE-SUCRE, A. et al. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2017.

30° Encontro Anual de Iniciação Científica
10° Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



11 e 12 de novembro de
2021

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29240765/>>. Acesso em: 27 ago. 2021.