

AVALIAÇÃO DA AÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM HIPERICINA LIVRE E ASSOCIADA AO PLURONICO F127 NA MEMBRANA MITOCONDRIAL DE PROMASTIGOTAS DE *Leishmania amazonensis*.

Tiffany Suzawa (PIBIC/CNPq/FA/Uem), Larissa Ferreira de Oliveira, Ana Carolina Vieira de Oliveira, Profª Drª Daniele Stefanie Sara Lopes Lera Nonose, Profª Drª Maria Valdrinez Campana Lonardoní (Orientador), e-mail: ra112874@uem.br.

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

Área: Medicina II. **Subárea do conhecimento:** Doenças infecciosas e parasitárias

Resumo

Leishmania (Leishmania) amazonensis (LLA) é uma das espécies causadoras da leishmaniose que ocasiona lesões na pele. Seu tratamento atual é feito com fármacos que apresentam alta toxicidade para o organismo. A terapia fotodinâmica (TFD) já é usada no tratamento de várias enfermidades dermatológicas. Este projeto teve como objetivo estudar a ação da terapia fotodinâmica com hipericina livre e hipericina encapsulada em plurônico F127 sobre a membrana mitocondrial de formas promastigotas de LLA. Para isso, as promastigotas foram tratadas com a concentração inibitória para 50% dos parasitos e o dobro da mesma, tanto para a hipericina livre quanto encapsulada em F127. A despolarização da membrana mitocondrial foi observada com o uso do fluoróforo Rodamina 123 (Rh123) e a leitura foi feita em citômetro de fluxo. Foi observada despolarização significativa da membrana mitocondrial de promastigotas de LLA causada por TFD com hipericina em sua forma livre e encapsulada com F127 tanto após 4 horas como após 24 horas. Esse achado aponta a despolarização mitocondrial como um dos prováveis mecanismos de ação desses fotossensibilizadores em *Leishmania*.

Palavras-chave: *Leishmania*, hipericina, fotossensibilizador.

Introdução

As leishmanioses são parasitoses endêmicas que afetam dezenas de países no mundo. São causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, cujos vetores são os flebotomíneos. No Brasil, a espécie mais comum é a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (LLA), agente etiológico da leishmaniose tegumentar (LT), que afeta principalmente a pele e as mucosas (BRASIL, 2017). O tratamento da LT é feito principalmente com antimoniais pentavalentes, como o glucantime®, pentamidina, anfotericina B lipossomal e miltefosina. Esses fármacos são tóxicos e causam muitos efeitos adversos, o que pode contribuir para a baixa adesão dos pacientes ao tratamento, além do risco de indução de resistência a estes fármacos (BRASIL, 2017).

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma metodologia fotoquímica baseada na ação de drogas fotossensibilizadoras que são ativadas na presença de oxigênio e luz, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio e causando morte celular localizada. Essa técnica já é consolidada no tratamento de diversas enfermidades dermatológicas e destaca-se por seu efeito direcionado (NESI-REIS et al., 2018). A hipericina é um fotossensibilizador derivado da antraquinona com destaque por suas propriedades antimicrobianas, anti tumorais e leishmanicidas. Pode ser encapsulada por micelas de copolímeros triblocos nanocarreadores, como o F127 (Pluronic® da BASF CO.) (DE FREITAS et al., 2016). Dessa forma, este trabalho teve como objetivo compreender a ação da terapia fotodinâmica com hipericina e hipericina encapsulada com F127 sobre a membrana mitocondrial de formas promastigotas de LLA.

Materiais e métodos

Obtenção do composto teste fotossensível e fonte de luz: as substâncias fotossensíveis utilizadas foram a hipericina e hipericina encapsulada com pluronico F127 a 0,5% m/v (formulado), fornecidos pelo Professor Dr. Renato Sonchini Gonçalves do Núcleo de Pesquisas em Sistemas Fotodinâmicos da Universidade Estadual de Maringá (NUPESF) e a aluna de iniciação científica Ana Carolina Vieira de Oliveira. A hipericina isolada foi diluída em DMSO (sulfóxido dimetílico) e o formulado em meio de cultura RPMI pH 6,8. A fonte de luz utilizada na TFD foi fornecida pelo professor Dr. Paulo Cesar Souza Pereira e consiste em um conjunto de LEDs brancos (500 to 700 nm) com 19,2 mW/cm² de luz.

Ensaio de determinação do potencial de membrana mitocondrial de L. (L.) amazonensis: as culturas de promastigotas de LLA foram centrifugadas e uma suspensão contendo 4×10^7 leishmanias/mL foi preparada e adicionada em uma placa de 24 poços. Ambos fotossensibilizadores foram diluídos em meio RPMI pH 6,8 e adicionados sobre os parasitos em placa. As concentrações testadas foram referentes aos valores conhecidos de IC50 (concentração inibitória para 50% dos parasitos) e duas vezes o IC50. Foram respectivamente 18,11 μ M e 36,22 μ M para hipericina livre e 15,58 μ M e 31,16 μ M para o formulado. Peróxido de hidrogênio 2 mM foi utilizado como controle positivo de despolarização de membrana mitocondrial das leishmanias. A placa foi incubada por meia hora seguida de meia hora de iluminação com a fonte de LED branca. Após esse período foi realizada análise por citometria de fluxo nos períodos de 4 horas e 24 horas. Para isso, alíquotas das culturas tratadas e dos controles foram lavadas por centrifugadas com tampão fosfato salino (PBS), ressuspensas em uma solução contendo (Rh 123 a 5 μ g/mL) e incubadas por 15 minutos a 37°C. Após novas lavagens com PBS e incubação de 30 minutos a 37°C, as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo nos canais de fluorescência FL1 (510 – 530 nm) e FL2 (fluorescência residual). O índice de variação (IV) quantifica esse evento associando valores obtidos nas análises dos compostos testados em promastigotas (MT) com o controle de leishmania sem tratamento (MC) através da fórmula $MT - MC / MC$.

Resultados e Discussão

Os índices de fluorescência da Rh 123 mostraram uma intensa despolarização de membrana mitocondrial das formas promastigotas de LLA tratadas com os fotossensibilizadores hipericina livre e formulada, após iluminação por luz LED.

O fluoróforo Rh 123 é um corante fluorescente que é sequestrado por mitocôndrias em estado de potencial de membrana normal e quando exposta a determinado comprimento de onda exibe fluorescência. Em casos de alteração desse potencial, ocorre efluxo dessa substância e conseqüentemente menores índices de fluorescência são detectados. Os valores são obtidos por meio da leitura em citômetro de fluxos. Valores negativos de **IV** indicam despolarização, enquanto valores positivos indicam hiperpolarização das membranas mitocondriais dos parasitos (DAGNINO *et. al*, 2017).

Os valores de **IV** obtidos estão descritos na Tabela 1. É possível observar que em ambos os períodos de análise os fotossensibilizadores testados apresentaram um elevado potencial despolarizante de membrana mitocondrial, superiores ao controle de peróxido de hidrogênio. O peróxido sofreu uma redução de **IV** entre os períodos analisados, indicando um aumento da despolarização com maiores tempos de incubação. No entanto, o oposto foi observado com a hipericina e o formulado, que passaram por um aumento do **IV** entre o período de 4 horas e o período de 24 horas, sinalizando um discreto efeito de despolarização transitório.

A despolarização das substâncias foi semelhante entre cada uma das concentrações testadas, entretanto a hipericina livre apresentou um potencial despolarizante ligeiramente superior ao formulado no período de quatro horas. Essa diferença foi igualada no período de 24 horas.

Singh *et al* (2014) colaboradores determinaram a inibição da enzima espermidina como um dos mecanismos de ação da hipericina em formas promastigotas de LLA. No entanto, outros mecanismos leishmanicidas deste fotossensibilizador não foram totalmente elucidados. Considerando a importância da função mitocondrial para respiração celular e manutenção de vida da *Leishmania* (DAGNINO *et. al*, 2017), os achados deste trabalho apontam a despolarização mitocondrial como importante mecanismo de ação da hipericina livre ou encapsulada por plurônico F127 associadas a TFD contra leishmaniose.

Tabela 1 - Valores de Índice de variação (VI) obtidos em 4h e 24h

Compostos	Concentração [µM]	4 h	24 h
NC	-	0,00	0,00
PC	2.000	-0,77	-0,92
HY IC50	18,11	-0,99	-0,96
HY 2XIC50	36,22	-0,99	-0,96
HY F127 IC50	15,58	-0,98	-
HY F127 2XIC50	31,16	-0,98	-0,96

NC - Controle Negativo; PC - Controle Positivo; HY - Hipericina; HY F127 - Hipericina encapsulada com plurônico F127

Conclusão

Foi observada despolarização significativa da membrana mitocondrial de formas promastigotas de *L. amazonensis* causada por TFD com hipericina em sua forma livre e encapsulada por plurônico F127 após 4 horas e 24 horas. Esse achado aponta a despolarização mitocondrial como um provável mecanismo de ação desses fotossensibilizadores em *Leishmania*.

Agradecimentos

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

Referências

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

DAGNINO APA, MESQUITA CS, DORNELES GP, *et al.* Phloroglucinol derivatives from *Hypericum* species trigger mitochondrial dysfunction in *Leishmania amazonensis*. **Parasitology**. 145(9):1199-1209, 2018.

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.* 92, 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**, 2018.

SINGH S, *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**. 13;59(1):15–24, 2014.