

INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE DE DERIVADOS DA ERITROSINA TIPO BUTIL E DECIL INCORPORADOS EM PLURÔNICOS® DE P-123 NA TERAPIA FOTODINÂMICA PARA OS PROTOZOÁRIOS *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Letícia Naomi Matsumoto (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré, 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.

Área: Ciências da Saúde **Sub-área do conhecimento:** Farmácia

Palavras-chave: *Leishmania*, terapia fotodinâmica, eritrosinas.

Resumo

A leishmaniose tegumentar (LT) é uma doença infecciosa, não contagiosa, cujo tratamento apresenta algumas limitações. Assim, a terapia fotodinâmica representa uma alternativa, pois além de demonstrar resultados promissores, tanto *in vitro* como *in vivo*, é uma técnica simples, não invasiva e não requer tecnologia de alto custo. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade das eritrosinas tipo butil e decil incorporados em plurônics® de P123 na terapia fotodinâmica nas formas amastigotas da *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Em decorrência de algumas adversidades enfrentadas no decorrer do projeto, o objetivo inicial não foi totalmente alcançado. Dessa forma, os esforços foram direcionados também na investigação da citotoxicidade dos compostos sobre os macrófagos/monócitos da linhagem THP-1. Os dados obtidos indicaram alta citotoxicidade em todas as concentrações analisadas tanto na presença quanto na ausência de luz. Tal característica pode ser interessante para um fármaco de uso tópico. Novos experimentos ainda estão em andamento para confirmar e complementar os resultados.

Introdução

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitidos através da picada de insetos flebotomíneos fêmeas do gênero *Lutzomya*. Estes protozoários se desenvolvem como formas promastigotas (flagelados) no trato digestivo dos vetores, que ao picar e tentar ingerir o sangue dos hospedeiros vertebrados inoculam os parasitos, que são fagocitados por células mononucleares. Nestas células se transformam em formas amastigotas (aflageladas) e se multiplicam até o rompimento da célula, liberando novos parasitos, o que pode resultar em uma lesão crônica (BRASIL, 2017). A terapia da leishmaniose, atualmente, apresenta algumas limitações, como a toxicidade, elevados custos, longos períodos de tratamento e efeitos adversos. Por esses motivos, existe uma necessidade crescente em desenvolver novas drogas mais

eficazes, seguras e acessíveis para o tratamento da leishmaniose tegumentar (LT) (MACEDO-SILVA, 2015).

Assim, a terapia fotodinâmica (TFD) é considerada uma alternativa, sendo um método que gera espécies reativas de oxigênio capazes de causar estresse oxidativo e morte das células do tecido doente (WAN, 2014). Como as substâncias fotossensíveis são geralmente hidrofóbicas e se agregam em meio aquoso, processo que prejudica sua aplicação na TFD e limita a disponibilidade de drogas, é proposto a incorporação destas as substâncias fotossensíveis em micelas poliméricas triblocos, na tentativa de evitar este efeito indesejável, sendo os Plurônicos® P123 um bom exemplo para liberação controlada da substância hidrofóbica no tecido alvo (KATAOKA, 2001). Diante disso, este estudo tem como objetivo a avaliação da atividade das eritrosinas tipo butil e decil incorporados em plurônicos® de P123 na terapia fotodinâmica sobre formas amastigotas da *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Materiais e Métodos

Cultura e manutenção de L. (V.) braziliensis

Formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foram mantidas por repiques semanais em meio de cultura 199 suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e cultivadas a 25°C.

Cultura e manutenção de monócitos da linhagem THP-1

Monócitos da linhagem THP-1 foram mantidos por repiques semanais em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) e cultivados a 37°C e 5% de CO₂.

Ensaio citotóxico sobre os monócitos da linhagem THP-1

Monócitos da linhagem THP-1 (5×10^5 células/mL) foram distribuídos em 2 placas de cultura de 96 poços, na presença de éster de forbol (PMA) e incubados por 48 horas em ambiente com 5% de CO₂ a 37°C, a fim de realizar a diferenciação monócito-macrófago. Em seguida, foi realizada uma lavagem para retirar as células em suspensão, além de efetuar a troca do meio de cultura com o propósito de manter nutricionalmente as células aderidas. Após incubação de 24 horas, diferentes concentrações (30, 7,5, e 1,9 μ M) de ERIBUT e ERIDEC incorporados em Plurônicos® de P123 foram adicionados sobre os macrófagos, sendo que em seguida uma placa foi iluminada com LED verde por 30 minutos e a outra permaneceu sobre a ausência de luz. Após outra incubação de 24 horas, a viabilidade celular foi determinada por espectrofotometria a 450/620 nm, a partir do composto formazan formado após a redução do XTT por formas viáveis de macrófagos. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos para células não tratadas (controles).

Ensaio citotóxicos sobre formas amastigotas

Monócitos da linhagem THP-1, 5×10^5 células/500 μ L, foram distribuídos em placas de cultura de 24 poços, sobre lamínulas de vidro, na presença de éster de forbol (PMA) e incubados por 48 horas em ambiente com 5% de CO₂ a 37°C, a fim de realizar a diferenciação monócito-macrófago. Posteriormente, os macrófagos foram infectados com promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (7 parasitos/célula) e incubados por 4 h para obter a infecção por formas amastigotas. Diluições das soluções testes (30, 7,5 e 1,9 μ M) foram adicionadas as placas e incubadas por 30 minutos. Em seguida, uma placa permaneceu na ausência de luz e a outra recebeu iluminação com LED verde por mais 30 minutos. Após incubação de 24 horas, as células aderentes em lamínulas foram fixadas e coradas com Panótico rápido para a determinação do índice de infecção (ii=porcentagem de macrófagos infectados multiplicado pelo número médio de *Leishmania* por célula infectada).

Análise e controle dos resultados

Os dados foram tabulados no *software* Excel, realizou-se média e desvio padrão. Foram também realizados controles de turbidez das diluições das drogas e meio RPMI 1640. O experimento foi realizado em duplicata.

Resultados e Discussão

Em decorrência de algumas adversidades enfrentadas, como a baixa no estoque de células (THP-1, macrófagos J774A.1 e parasitos), atraso na aquisição das cepas padrão de *Leishmania*, contaminação de culturas, problemas técnicos com a estufa (37°C e 5%CO₂) e baixa viabilidade celular, o objetivo inicial do projeto não foi alcançado. Foram realizados diversos experimentos, no entanto, a infecção dos macrófagos por promastigotas não ocorreu, inviabilizando a determinação do índice de infecção (Figura 1). Dessa forma, os esforços foram direcionados também na execução da citotoxicidade dos compostos sobre os macrófagos/monócitos da linhagem THP-1.

Em relação, aos resultados da citotoxicidade, foi observado que a ERIDEC, na ausência de luz na concentração de 30 μ M obteve uma viabilidade de 11%. Enquanto nas demais concentrações, tanto na presença de luz ou não a viabilidade foi de 0%. Quanto a ERIBUT, também foi observado que em todas as concentrações, na presença e ausência de luz, resultou em uma viabilidade igual a 0%. Assim, pode-se constatar que os compostos incorporados em Plurônicos® de P123 apresentam alta toxicidade celular. Outro estudo verificou que a micela isolada demonstrou moderada citotoxicidade sobre macrófagos peritoneais murinos nas concentrações de 1,25 a 20 mg/mL (OYAMA, 2019). Desse modo, a toxicidade possivelmente está relacionada aos compostos e aos Plurônicos® de P123.

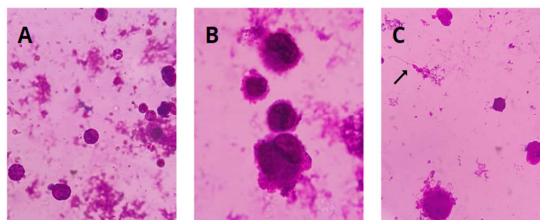


Figura 1 – Células sem a presença de amastigotas (A e B). Seta indicando a presença de *L. (V.) braziliensis* na forma promastigota (C).

Conclusões

Os derivados da eritrosina tipo butil e decil incorporados em Plurônicos® de P123 sobre monócitos da linhagem THP-1 na terapia fotodinâmica apresentaram alta citotoxicidade em todas as concentrações analisadas tanto na presença quanto na ausência de luz. Os dados obtidos indicaram alta citotoxicidade, característica que pode ser interessante para um fármaco de uso tópico. Novos experimentos ainda estão em andamento para confirmar e complementar os resultados.

Agradecimentos

Agradeço ao Laboratório de Imunologia Clínica e a Universidade Estadual de Maringá (UEM).

Referências

BRASIL; Secretaria de Vigilância em Saúde; Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

KATAOKA K.; HARADA A.; NAGASAKI Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, n. 1, p. 113-131, 2001.

MACEDO-SILVA, S.T. et al. Potent *In Vitro* Antiproliferative Synergism of Combinations of Ergosterol Biosynthesis Inhibitors against *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob Agents Chemother** v. 59, n. 10, p. 6402-6418, 2015.

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.

WAN, M. T.; LIN, J. Y. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. **Clin Cosmet Investig Dermatol.**, v. 7, p. 145-163, 2014.