

ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTI-*LEISHMANIA* DA HIPERICINA: EXTERNALIZAÇÃO DA FOSFATIDILSERINA E FRAGMENTAÇÃO DE DNA

Alanis Boer dos Reis (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Larissa Ferreira de Oliveira, Ana Carolina Vieira de Oliveira, Prof Dr Wilker Caetano, Prof^a Dr^a Daniele Stefanie Sara Lopes Lera Nonose, Prof^a Dr^a Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré, Prof^a Dr^a Maria Valdrinez Campana Lonardoni (Orientador). E-mail: ra130399@uem.br.

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

Área: Saúde coletiva. **Subárea:** Medicina Preventiva

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; tratamento; leishmanioses.

RESUMO

A leishmaniose é uma das dez principais doenças tropicais negligenciadas mundialmente, sendo endêmica em 99 países. Pensando nisso, este trabalho teve como principal objetivo o estudo dos mecanismos de ação da hipericina associada à terapia fotodinâmica (TFD) na indução da morte celular de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. A metodologia envolveu a incubação de promastigotas com hipericina livre (H) e incorporada ao plurônico F-127 (HF127), seguida de iluminação com LED e posterior avaliação do potencial de membrana mitocondrial e externalização de fosfatidilserina por meio de citometria de fluxo e análise de fragmentação de DNA por eletroforese. Os resultados de externalização de fosfatidilserina indicaram apoptose. Ambos os compostos induziram a despolarização de membrana mitocondrial das formas promastigotas; o tratamento também mostrou padrões indicativos de fragmentação de DNA indicando também apoptose. Em conjunto os resultados sugerem que o tratamento das promastigotas com hipericina leva à morte celular, provavelmente pelo mecanismo de indução de apoptose, sendo a HF127 o composto com maior eficácia. Conclui-se que a hipericina, especialmente quando formulada com nanocarreadores, é uma candidata promissora para o desenvolvimento de novos tratamentos contra leishmaniose tegumentar.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses estão entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas, sendo endêmicas em 99 países, entretanto as ferramentas de prevenção e controle disponíveis são limitadas (Who, 2022). A Leishmaniose Tegumentar (LT) é uma doença infecciosa não contagiosa, que acomete a pele e mucosas. Os parasitos, do gênero *Leishmania*, possuem duas formas principais: promastigotas encontradas nos vetores, insetos flebotomíneos, e amastigotas presentes no interior de células fagocíticas do hospedeiro (Brasil, 2017). No Brasil, a espécie *Leishmania amazonensis* (LLA), responsável pela forma anérgica da doença, é uma das mais endêmicas (Brasil, 2017). Atualmente, são poucos os fármacos disponíveis para tratamento da LT, sendo os antimoniais pentavalentes os de primeira escolha, e a anfotericina B de segunda escolha, além das pentamidinas e pentoxifilina. Entretanto, todos esses fármacos podem apresentar efeitos colaterais severos, ineficácia e indução de resistência, além da invasividade e longos períodos de tratamento. A partir disso, torna-se essencial a busca por novas técnicas e fármacos para tratamento e controle da doença (BRASIL, 2017). A hipericina, isolada de plantas da família *Hypericum* classificada como naftodiantrona, é muito conhecida por apresentar efeitos antidepressivos, anti-inflamatórios, anti-cancerígenos e antimicrobianos (Kariot et al, 2010). Pesquisas recentes mostram que ela é um fotossensibilizador com amplo potencial para uso na terapia fotodinâmica (TFD) (Kariot et al, 2010). O objetivo deste estudo foi analisar o mecanismo de ação pelo qual a hipericina associada à TFD provoca a morte celular das formas promastigotas de LLA.

MATERIAIS E MÉTODOS

Ensaio de determinação do potencial de membrana mitocondrial de LLA

Uma solução contendo 4×10^7 leishmanias/mL foi preparada sobre uma placa de 24 poços. Ambos fotossensibilizadores foram diluídos em meio RPMI pH 6,8 e adicionados sobre os parasitos em placa. As concentrações estudadas foram referentes aos valores conhecidos de IC₅₀ (concentração inibitória para 50% dos parasitos) e duas vezes a IC₅₀, 18,11 μ M e 36,22 μ M para hipericina livre (H) e 15,58 μ M e 31,16 μ M para hipericina incorporada ao plurônico F-127 (HF127), respectivamente. Para o controle positivo de despolarização de membrana mitocondrial utilizou-se peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A placa foi incubada por 30 minutos seguida de 30 minutos de iluminação com a fonte de LED branca. Após 24 horas de incubação procedeu-se a análise por citometria de fluxo.

Ensaio de fragmentação de DNA de LLA

As suspensões contendo 4×10^7 promastigotas/mL de LLA foram incubadas na concentração de IC₅₀ de hipericina livre (H) (18,17 μ M) e hipericina incorporada ao plurônico F-127 (HF127) (16,41 μ M) durante 30 minutos, seguindo-se de 30 minutos de iluminação com a fonte de LED. Após 24 horas de incubação, o DNA completo dos parasitos foi extraído com fenol e clorofórmio e precipitado com acetato de sódio 3M e etanol, e ressuspensos com tampão Tris-EDTA. Foi realizada a eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídeo e os resultados foram fotografados através de luz ultravioleta (UV). Os produtos da extração de todas as amostras também foram submetidos à reação em cadeia da polimerase tradicional, com iniciadores específicos para um gene de *Leishmania* e revelados por eletroforese em gel de agarose. A fragmentação foi confirmada com a ausência de amplificação.

Ensaio de avaliação da externalização de fosfatidilserina em promastigotas de LLA

As suspensões contendo 2×10^7 parasitos/mL de formas promastigotas de LLA foram incubadas nas concentrações de IC₅₀ de hipericina livre (H) (18,17 μ M), hipericina incorporada ao plurônico F-127 (HF127) (16,41 μ M) e anfotericina B (1 μ g/mL), durante 30 minutos, seguida de 30 minutos de iluminação com a fonte de LED. Após uma nova incubação de 4 e 24 horas as amostras foram processadas com kit Anexina V (Annexin V-FITC Apop Kit 100 tests, Invitrogen®, USA&Canada). A aquisição e análise de dados foi realizada usando um citômetro de fluxo FACSCalibur™ equipado com o *software CellQuest*. Os parasitos corados com anexina V são considerados apoptóticos pela detecção de fosfatidilserina, e as células coradas com iodo de propídeo (PI) são consideradas necróticas ou em apoptose tardia.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na avaliação do potencial de membrana mitocondrial observou-se que H e HF127 induzem a despolarização de membrana mitocondrial das promastigotas de LLA. A despolarização em 4h foi superior comparado à 24h, indicando que parte da despolarização é transitória. O tratamento também mostrou padrões indicativos de fragmentação de DNA. Na avaliação da externalização da fosfatidilserina, devido à fluorescência natural da hipericina em vermelho não foi possível confirmar se a apoptose era tardia ou recente, mas a fluorescência do marcador de anexina V indica apoptose, já em 4 horas tratando-se do formulado e em 24 da H, como destacado na Tabela 01.

Tabela 1 - Análise da determinação da externalização da fosfatidilserina pela ligação da Anexina V através do índice de fluorescência por citometria de fluxo

PERÍODO	QUADRANTE	NC	PC	AMB	HYP CT	HYP	HYPF127 CT	HYPF127
		Média de promastigotas por quadrante (%)						
4 horas	UL	0,7	9,7	6,5	93,5	94,1	97,3	72,7
	UR	4,2	0,9	82,5	0,1	2,4	0,2	26,8
	LL	94,3	89,4	11,0	6,4	3,5	2,4	0,6
	LR	0,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
24 horas	UL	9,895	2,7	2,8	95,6	84,3	98,8	67,5
	UR	11,27	96,0	96,7	0,1	11,2	0,2	31,3
	LL	78,76	1,3	0,6	4,3	4,5	1,0	1,2
	LR	0,075	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Abreviações: NC - controle negativo; PC - controle positivo; AMB - anfotericina B; HYP CT - hipericina controle: sem FITC e PI; HYP - hipericina; HYPF127 CT - hipericina incorporada ao plurônico F127 controle: sem FITC e PI; HYPF127 - hipericina incorporada ao plurônico F127; PI - iodeto de propídio; FITC - Isotiocianato de fluoresceína; UL - Upper Left; UR - Upper Right; LL - Low Left e LR - Low Right.

CONCLUSÕES

A hipericina, especialmente a formulada com nanocarreadores (HF127), é eficaz na indução de apoptose em formas promastigotas de LLA. Esses resultados sugerem forte potencial da hipericina para futuros estudos e desenvolvimento de um tratamento alternativo para LT.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Maringá e ao órgão de fomento do projeto e ao CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio no desenvolvimento do projeto.

REFERÊNCIAS

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

KARIOTI, A.; BILIA, A. R. Hypericins as Potential Leads for New Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 11, n. 2, p. 562-594, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis. Geneva: WHO, 2022. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1. Acesso em: 20 de agosto de 2024.