

ATIVIDADE DA HIPERICINA LIVRE E ENCAPSULADA COM PLURÔNICO® F127 NA TERAPIA FOTODINÂMICA SOBRE FORMAS AMASTIGOTAS DE LEISHMANIA

Ana Paula Rizzo Bueno (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Larissa Ferreira de Oliveira, Wilker Caetano, Daniele Stéfanie Sara Lopes Lera Nonose, Áquila Carolina Fernandes Herculano Ramos Milaré, Maria Valdrinez Campana Lonardoní (Orientador). E-mail: mvclonardoní@gmail.com

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

Área: Ciências da Saúde e Saúde Coletiva. **Subárea do conhecimento:** Medicina Preventiva.

Palavras-chave: Hipericina; fototerapia; leishmaniose tegumentar.

RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania* e são um problema de saúde pública em muitos países. A leishmaniose tegumentar se manifesta por lesões na pele e mucosas, isoladas ou múltiplas, com bordas bem delimitadas. Atualmente, os antimoniais prevalentes são usados para o tratamento da doença, porém, devido aos seus efeitos adversos e a sua toxicidade, a pesquisa acerca de novas alternativas terapêuticas é importante. A terapia fotodinâmica em associação com a hipericina livre e com a hipericina encapsulada com plurônico® F-127 têm se mostrado muito promissora. Neste trabalho, foi avaliada a ação da hipericina livre e encapsulada por plurônico F-127 em terapia fotodinâmica para formas amastigotas intracelulares *L. (L.) amazonensis* e a produção de derivados de nitritos. Os resultados mostraram um efeito anti-leishmania da hipericina livre e encapsulada, especialmente com o uso da terapia fotodinâmica. A redução do índice de infecção chegou a 61,36% para a hipericina encapsulada (0,66µM) em associação com a terapia fotodinâmica. Não foi observada a produção significativa de derivados de nitritos em nenhuma das concentrações estudadas, na presença ou ausência de luz, tanto da hipericina livre quanto para a encapsulada. Tanto a hipericina livre quanto a encapsulada demonstraram ser promissores agentes fotossensibilizadores, cujo mecanismo de ação é independente da produção de derivados de nitrito.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar (LT) é um conjunto de doenças infecciosas, não contagiosas, caracterizadas por acometer pele e mucosas, e serem um problema de saúde pública em diversos países. *Leishmania* é um parasito intracelular obrigatório das células do sistema fagocítico mononuclear, no qual assume a forma amastigota. Atualmente, os antimoniais prevalentes são fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, entretanto, existem significativos efeitos adversos

que podem comprometer o processo terapêutico (BRASIL, 2017). Desse modo, é de grande importância que novas alternativas terapêuticas sejam estudadas.

Novas terapias, como a terapia fotodinâmica, têm surgido como uma alternativa aos medicamentos existentes para o tratamento da LT. Caracteriza-se por ser um método não invasivo e localizado, que emprega ativos fotossensibilizantes com comprimentos de onda específicos de luz. Em outros estudos, seu uso tem se mostrado eficaz tanto na redução do tamanho das lesões cutâneas quanto na carga parasitária de pacientes com leishmaniose (Sepúlveda *et al.* 2020). Uma vez que o agente fotossensibilizante é ativado pela luz, a produção de espécies reativas de oxigênio com potencial para destruir o microrganismo ou a célula, é induzida (Montoya *et al.* 2015).

A hipericina é uma antraquinona fotoativa, derivada de *Hypericum perforatum*, conhecida como erva de São João (Alves *et al.* 2014). Seus extratos são usados para tratar escoriações, cortes e feridas, possuindo efeito anticancerígeno, propriedades fungicidas, bactericidas e antivirais (Krupka-Olek *et al.* 2024). Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a ação da hipericina livre e encapsulada por plurônico® F-127 em terapia fotodinâmica para formas amastigotas intracelulares *L. (L.) amazonensis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção do composto teste e fonte de luz

A hipericina e a hipericina encapsulada com plurônico® F-127 a 0,5% m/v (formulado), foram fornecidas pelo Prof. Dr. Wilker Caetano do Núcleo de Pesquisas em Sistemas Fotodinâmicos da Universidade Estadual de Maringá. Para a iluminação foi usado o diodo emissor de luz (LED) de cor branco-quente e irradiância de 19,2 mW/cm².

Ensaio sobre formas amastigotas de L. (L.) amazonensis

O parasito *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1977/LTB0016) (LLa) foi mantido por repiques semanais em meio de cultura 199, pH 7,2. Culturas de macrófagos imortalizados da linhagem J774 A.1 foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640, pH 7,6, e antes dos experimentos em pH 6,8. A suspensão de macrófagos foi distribuída sobre lamínulas de vidro, em poços de placas de 24 poços. As placas foram incubadas por 2 h e 30 min. em estufa de CO₂ a 37°C. Em seguida, os macrófagos foram infectados com promastigotas de LLa e incubados durante 4 h a 37°C, para internalização dos parasitos. A hipericina encapsulada (IC50 16,41 µM) e não encapsulada (IC50 18,17 µM) foram testadas em três concentrações diferentes, correspondentes a 25, 50 e 75 vezes menores do que a concentração inibitória para 50% dos parasitos. Uma das placas foi exposta à iluminação por LED por 30 min. e a outra não, ambas tendo controles sem adição das drogas. Após 24 h de incubação, as lamínulas foram lavadas em PBS, coradas com o Kit Panótico e fixadas a lâminas de vidro. Posteriormente, foram examinadas ao microscópio óptico sendo analisadas 200 células em cada lamínula. O índice de infecção (IF) foi

calculado multiplicando-se o percentual de macrófagos infectados pelo número médio de parasitos nos macrófagos. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Dosagem de óxido nítrico

Os níveis de nitritos foram determinados nos sobrenadantes das culturas, com o uso do reagente de Griess (1% de sulfanoilamida, 0,1% de N-(1-naftil)-etilenodiamina diidroclorídrica e 2,5% de ácido ortofosfórico) (Sigma-Aldrich®). Células infectadas não tratadas e células não infectadas estimuladas com 5 µg/mL de lipopolissacarídeo (LPS) foram usadas como controles negativo e positivo, respectivamente. A absorbância foi medida por espectrofotometria em 550/620 nm. Os níveis de nitritos foram calculados por meio de uma curva padrão com nitrito de sódio (NaNO₂).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O efeito das concentrações da hipericina livre e encapsulada sobre o índice de infecção está demonstrado na figura 1. Observa-se que houve uma diferença expressiva entre todas as concentrações expostas à luz quando comparada às não expostas. A redução do índice de infecção para todas as concentrações de hipericina livre e encapsulada, submetidas à luz foi superior à 50%, o que demonstra uma boa atividade anti-leishmania. Montoya *et al.* (2015) aponta que a atividade anti-leishmania da hipericina irradiada e não irradiada é provavelmente devida à inibição específica da espermidina sintase, associada quando irradiada a produção de espécies reativas de oxigênio e de citocinas pró-inflamatórias sintetizadas por macrófagos. A maior redução encontrada com o uso da terapia fotodinâmica foi na concentração -25x do IC50, tanto para a hipericina, quanto para a hipericina encapsulada, indicando um efeito dose dependente. Esses resultados concordam com os de Sepúlveda *et al.* (2020) que relatam que a hipericina é um composto não tóxico e não mutagênico, A hipericina é aprovada para uso humano nos EUA e seu potencial para tratar a LT em terapia fotodinâmica já tem sido descrito.

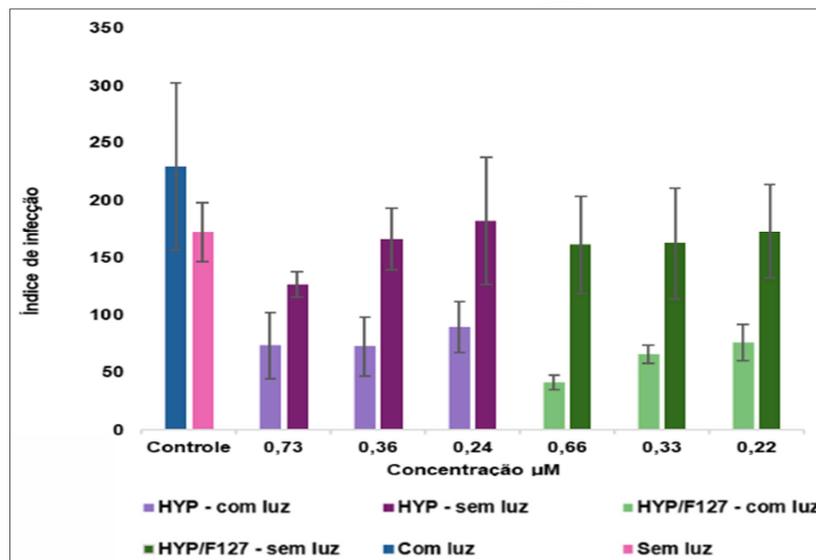


Figura 1. Ação da hipericina livre e hipericina + Plurônico® F-127 sobre *L. amazonensis*.
HYP: hipericina livre. HYP/F127: hipericina encapsulada por Plurônico®.

A hipericina e a hipericina encapsulada com plurônico F-127 tanto na presença quanto na ausência de luz não estimularam a produção significativa de derivados de nitrito em macrófagos infectados por *Leishmania*. Isso sugere que o mecanismo destes fármacos não é dependente da produção de derivados de nitrito.

CONCLUSÕES

Os agentes fotossensibilizadores hipericina livre e hipericina encapsulada com o plurônico F-127 tem atividade anti-leishmania sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* independente da produção de derivados de nitrito.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Estadual de Maringá e à Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

ALVES, A. C. S. *et al.* Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 16, n. 3, p. 593–606, 2014. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/rbpm/a/fDCwzdfPvGJBvvhK8gbnjpQ/>.

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

KRUPKA-OLEK, Magdalena *et al.* Cytotoxic and Immunomodulatory Effects of Hypericin as a Photosensitizer in Photodynamic Therapy Used on Skin Cell Cultures.

Pharmaceutics, v. 16, n. 6, p. 696, 2024. Disponível em:
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572100020300296?%3Dihub>

MONTOYA, Andrés *et al.* Development of a novel formulation with hypericin to treat cutaneous leishmaniasis based on PDT *in vitro* and *in vivo* studies. **Antimicrobial Ag. and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5804–5813, 2015. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26169411/>.

SEPÚLVEDA, Alex Arbey Lopera *et al.* Efficacy of photodynamic therapy using TiO₂ nanoparticles doped with Zn and hypericin in the treatment of cutaneous Leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Photodiag. Photodynamic Therapy**, v. 30, p. 101676, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1572100020300296?%3Dihub>