



ATIVIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM AZUL DE METILENO E LED'S SOBRE *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Mônica Raquel Sbeghen¹, Tacito Graminha Campos¹, Dayane Tozato Wakimoto¹; Thais
Gomes Verzignassi Silveira ²

RESUMO: Avaliar a atividade da terapia fotodinâmica com AM e LED sob formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. **Materiais e Métodos:** Os ensaios com a forma promastigota foram realizados com $1,1 \times 10^6$ promastigotas de *Leishmania amazonensis*/mL com AM nas concentrações de 0,1 $\mu\text{mol/mL}$ e 0,2 $\mu\text{mol/mL}$, tratados ou não com LED. Macrófagos intraperitoneais residentes de camundongos Balb/C foram infectados com *Leishmania amazonensis* e tratados com AM nas concentrações de 0,2 $\mu\text{mol/mL}$, 0,05 $\mu\text{mol/mL}$ e 0,025 $\mu\text{mol/mL}$ com ou sem LED. A dosagem de NO foi realizada no sobrenadante das culturas de macrófagos. **Resultados:** A luz não influenciou o crescimento das formas promastigotas cultivadas sem AM ($p > 0,05$). Os promastigotas tratados com AM nas concentrações de 0,1 $\mu\text{mol/mL}$ e 0,2 $\mu\text{mol/mL}$ e LED tiveram redução no crescimento quando comparados ao grupo controle sem tratamento com LED ($p < 0,05$). Macrófagos tratados com AM nas concentrações de 0,2 $\mu\text{mol/mL}$, 0,05 $\mu\text{mol/mL}$, 0,025 $\mu\text{mol/mL}$ e LED tiveram seu índice de infecção e percentual de macrófagos infectados reduzidos ($p < 0,05$), este índice também foi reduzido nos macrófagos tratados com AM nas concentrações de 0,2 $\mu\text{mol/mL}$ ($p < 0,05$) e 0,05 $\mu\text{mol/mL}$ ($p < 0,05$). Os macrófagos que receberam tratamento com AM e LED apresentaram redução nos níveis de NO produzidos, em todas as concentrações de AM avaliadas. **Conclusão:** A TFD com AM e LED inibiu o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, o índice de infecção, percentual de macrófagos infectados, número de leishmanias por macrófago e os níveis de óxido nítrico produzidos pelas células tratadas com AM.

PALAVRAS-CHAVE: *Leishmania amazonensis*, terapia fotodinâmica, macrófagos, promastigotas.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecto parasitária que atinge cerca de 12 milhões de pessoas no mundo (Ministério da saúde, 2007). Esta zoonose é transmitida ao homem pela picada da fêmea do inseto do gênero *Phlebotomus* sp ou *Lutzomyia* sp, infectada com promastigotas do gênero *Leishmania* sp. As manifestações clínicas e a imunopatogênese das leishmanioses dependem da espécie da *Leishmania* envolvida e da resposta imune do hospedeiro. As leishmanioses podem se manifestar como tegumentar e visceral. A leishmaniose tegumentar americana (LTA) pode comprometer pele e mucosa. No Brasil, a LTA está presente em todos os estados do país e em 289 municípios do Paraná (Ministério da Saúde, 2007). Para o tratamento são usados antimonialis pentavalentes (N-metil-glucamina) como primeira escolha, porém este

¹ Acadêmicos do curso de pós graduação em Biociências Aplicadas a Farmácia da Universidade Estadual de Maringá – UEM. Maringá Paraná. monica.sbeghen@esefap.edu.br; tacitogc@yahoo.com.br; daywaki@hotmail.com

² Docente, orientadora do curso de pós graduação em Biociências Aplicadas a Farmácia da Universidade Estadual de Maringá – UEM. Maringá, Paraná. tgvsilveira@uem.br

tratamento pode provocar efeitos colaterais graves, abandono do tratamento pelo paciente, e casos em que não há cura. Nos últimos anos têm sido usados tratamentos alternativos para a LTA como a crioterapia, curetagem, eletrodissecação e terapia fotodinâmica (TFD) (Gardlo *et al*, 2003; Ministério da saúde, 2007). A TFD usa da administração de um composto fotossensível e a administração de luz neste fármaco. A partir da interação entre composto fotossensível e luz pode haver a formação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio (reação tipo I) (Lim *et al* 2002; Ribeiro *et al* , 2005; Castano *et al*, 2004) ou haver a interação do composto fotossensível no estado excitado (triplete) com o oxigênio molecular, gerando oxigênio singlete que é citotóxico (reação tipo II) (Ferguson, 2002; Konan *et al*, 2002). A TFD tem demonstrado benefícios no tratamento da leishmaniose tegumentar como a eliminação de amastigotas do parasito nos raspados da lesão. Os efeitos colaterais da TFD são restritos ao desconforto gerado pelo calor durante a terapia, hiperpigmentação e eritema local (Akilov *et al*, 2006; Akilov *et al*, 2007b; Enk *et al*, 2003). Porém, uma das limitações para o uso da TFD é o custo elevado de alguns sistemas de iluminação e de alguns compostos fotossensíveis (Akilov *et al*, 2006; Akilov *et al*, 2007).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade da TDF sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* usando azul de metileno como substância fotossensível e LED como fonte luminosa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Infectou-se macrófagos peritoneais residentes de camundongos Balb/C fêmeas com 6 promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269) por macrófago, os quais foram tratados com AM nas concentrações de 0,2 µmol/mL 0,05 µmol/mL e 0,025 µmol/mL com ou sem LED (de cor vermelha, com comprimento de onda aproximadamente de 663nm, com 5mW) durante 30 minutos. Foi realizado grupo controle sem infecção pelo parasito, assim como sem tratamento. As placas foram incubadas a 37°C em estufa contendo 5% de CO₂ por 24 horas. Após a incubação foram retirados 200µL do sobrenadante para dosagem de NO. As lamínulas foram lavadas em PBS, coradas com o Kit Panótico (HEMA 3[®]) e aderidas à lâminas de vidro com Entellan[®]. Os experimentos foram realizados em triplicata. Para determinação do índice de infecção foram examinadas 200 células em cada lamínula, contando-se o número de macrófagos infectados e o número de formas amastigotas totais. O Índice de infecção (IF) foi calculado multiplicando-se o percentual de macrófagos infectados pelo número médio de parasitos nos macrófagos. O óxido nítrico foi dosado no sobrenadante das culturas de macrófagos infectados com amastigotas, pelo método de Buffet (1995) com modificações. Os resultados foram expressos em µM de NO₂⁻, com base numa curva padrão com concentrações conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂). Os resultados foram submetidos aos testes estatísticos. Os procedimentos foram realizados de acordo com protocolos aprovados pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação da Universidade Estadual de Maringá (Parecer n° 020/2010).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao analisar os grupos controle sem AM na presença ou ausência de luz verificou-se que a presença de luz não influenciou na produção de NO por macrófagos (p=0,9033). Os níveis de NO apresentaram-se reduzidos nos grupos que receberam TFD, quando comparados aqueles tratados apenas com AM nas concentrações de 0,05 µg/mL (p=0,0092) e 0,025 µg/mL (p=0,0001) mas não em 0,2 µg/mL (p=0,104). O uso do AM sem a presença da luz não reduz os níveis de NO significativamente, nas concentrações analisadas 0,2 µmol/mL (p=0,228); 0,05 µmol/mL (p=0,507); 0,025 µmol/mL(p=0,456). A

iluminação dos macrófagos infectados, com LED não interferiu significativamente no índice de infecção dos macrófagos ($p=0,275$), no percentual de macrófagos infectados ($p=0,827$) nem no número de amastigota por macrófagos ($p=0,278$). O AM, nas três concentrações analisadas, reduziu significativamente o índice de infecção ($p=0,049$), o percentual de macrófagos infectados ($p=0,049$) e o número de leishmanias por macrófagos ($p=0,049$). A iluminação com LED nas culturas de macrófagos tratados com AM potencializou a redução do índice de infecção ($p=0,049$) e percentual de macrófagos infectados ($p=0,049$) em todas as concentrações e número de leishmanias por macrófagos ($p=0,049$) com exceção da concentração de $0,025 \mu\text{g/mL}$ ($p=0,054$). A aplicação de LED sobre promastigotas que não receberam AM não influenciou no crescimento do parasita, demonstrando desta forma que apenas a presença da fonte luminosa não é capaz de inibir ou estimular o crescimento desses parasitos, já que a TFD só ocorre em presença de composto fotossensível, fonte luminosa e presença de oxigênio. A presença da TFD pela aplicação de AM nas concentrações de $0,1 \mu\text{mol/mL}$ e $0,2 \mu\text{mol/mL}$ e LED como fonte luminosa foi capaz de reduzir com eficiência o crescimento destes parasitos, quando comparados aos grupos controles que não receberam nenhum tipo de tratamento com AM e LED. Valdivieso *et al* (2008) ao aplicarem TFD utilizando ftalocianina de alumínio, em promastigotas de *Leishmania amazonensis*, verificaram a inibição do crescimento do parasito em 96,7%, além de redução no tamanho da leishmania, fragmentação nuclear, e perda do núcleo, kinetoplasto e atividade mitocondrial, a partir da análise em microscopia eletrônica (Valdivieso *et al* 2008).

Ao analisar os níveis de NO produzido por macrófagos tratados ou não com TFD observou-se que apenas a presença do AM não interferiu significativamente na produção de NO por estas células em todas as concentrações analisadas indicando que apenas a presença do composto fotossensível não é capaz de ocasionar alterações bioquímicas que estimulem a produção de NO. No entanto percebe-se que a presença da luz é importante para que ocorra redução nos níveis de NO produzidos, em todas as concentrações de AM analisadas. (Costa *et al*, 2003; Castano *et al* 2006). A supressão da produção de NO durante a infecção por parasitas é comumente encontrada (Brunet *et al*, 2001). A TFD leva as células do sistema imunológico, como macrófagos a alterações em sua membrana que são capazes de inibir a secreção de citocinas pró inflamatórias, e também gerar alterações sistêmicas (Castano *et al*, 2006). Estas alterações de membrana dos macrófagos pode ter influenciado para que a produção de NO nestas células fossem reduzidos ao compará-los as células não tratadas com TFD (Castano *et al*, 2006).

4 CONCLUSÃO

Neste trabalho pode-se verificar que macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* e tratados com AM e LED apresentaram redução no índice de infecção e percentual de macrófagos infectados, demonstrando que a TFD usando o AM e LED tem atividade sobre *Leishmania amazonensis*.

REFERÊNCIAS

AKILOV OE, KOSAKA K, O'RIORDAN, SONG X, SHERWOOD M, FLOTTE TJ, FOLEY JW, HASAN T, The Role of Photosensitizer Molecular Charge and Structure on the Efficacy of Photodynamic Therapy against Leishmania Parasites. Chemistry and Biology, 13, 839–847 2006.

AKILOV OE, KOSAKA K, O'RIORDAN K, HASAN T. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite

eradication and Th1 immune response stimulation Photochemical & Photobiological Sciences 6, 1067–1075, 2007b.

CASTANO AP, DEMIDOVA TN, HAMBLIN MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. Photothodiag. Photodyn. Ther., Yorkshire, v. 1, n. 4, p. 279-293, Dec. 2004.

COSTA, Mirela Tinucci; FABENI, Rita de Cássia; APTEKMANN, Karina Preissing and MACHADO, Rosângela Racarias. Diferentes papéis do óxido nítrico com ênfase nas neoplasias. Ciencia. Rural. 2003, vol.33, n.5, p. 967-974.

ENK, Claes et al. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis With Photodynamic Therapy. Arch Dermatol, v.139, Apr 2003

FERGUSON J. Photosensitivity due to drugs. Photodermatol. Photoimmunol. Photomed., Copenhagen, v. 18, n. 5, p. 262-269, Oct. 2002.

GARDLO K, HORSKA Z, ENK CD, RAUCH L, MEGAHED M, RUZICKA T, FRITSCH C. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. Journal American Academic Dermatology, 48 (11), 893-896, 2003.

KONAN YN, GURNY R, ALLÉMANN E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. J. Photochem. Photobiol. B, Lausanne, v. 66, n. 2, p. 89-106, Mar. 2002.

Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde; 2006. http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/leishmaniose_2007.pdf - acessado em 15 de dezembro de 2009.

RIBEIRO, MS et al. Terapia fotodinâmica antimicrobiana. In: Livro virtual, 23° CIOSP, São Paulo, 2005, 26p. Disponível em <<http://www.netodonto.com.br/ciosp/index.php>>. Acesso em 10 nov. 2005.

VALDIVIESO W, HERNANDEZ IP, MARTINEZ F, PÁEZ E, ESCOBAR P, Efecto fototóxico de la terapia fotodinâmica em promastigotes de *Leishmania amazonensis*, Artículos originales.

VOULDOUKIS I, BECHEREL PA, RIVEROS-MORENO V, AROCK M, da SILVA O, DEBRE P, MAZIER D, MOSSALAYI MD. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. European Journal of Immunology, v.27, p. 860-865, 1997.