

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS E BIOMEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E
FISIOPATOLOGIA

VANESSA NESI

Drogas fotossensíveis para o estudo da atividade anti *Leishmania* da terapia
fotodinâmica

Maringá
2014

VANESSA NESI

Drogas fotossensíveis para o estudo da atividade anti *Leishmania* na terapia
fotodinâmica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia.

Área de concentração: Biociências e Fisiopatologia Aplicadas à Farmácia.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Maria Valdrinez C. Lonardoni.

Maringá
2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

N459d Mesl, Vanessa
Drogas fotossensíveis para o estudo da atividade anti *Leishmania* da terapia fotodinâmica / Vanessa Mesl. - - Maringá, 2014.
50 f. : il. color., tabs., figs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Valdrines Campana Lonardoni.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, 2014.

1. Leishmaniose cutânea. 2. Ftalocianinas. 3. Fotólise. 4. *Leishmania amazonensis*. 5. Citotoxicidade. I. Lonardoni, Maria Valdrines Campana, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia. III. Título.

CDD 22.ed.616.93
MGC - 001811

FOLHA DE APROVAÇÃO

VANESSA NESI

Drogas fotossensíveis para o estudo da atividade anti *Leishmania* na terapia
fotodinâmica

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia do Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biociências e Fisiopatologia pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Profª Drª Maria Valdrinez Campana Lonardoní
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Profª Drª Eliana Valéria Patussi
Universidade Estadual de Maringá

Drª Karin Rossi Reinhold de Castro
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 18 de dezembro de 2014.

Local de defesa: Sala 112-B, Bloco T-20, campus da Universidade Estadual de Maringá.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família,
com todo o meu amor e gratidão, pelo
amor incondicional, pelos valores
transmitidos, momentos de alegria, por
estarem sempre presentes em todos os
momentos da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida, pela sabedoria e inspiração. A minha família, pelo apoio, amor e carinho e por sempre acreditarem e depositarem em mim toda confiança.

Ao meu noivo, João Paulo, pelo amor, extrema compreensão e incentivo durante toda esta trajetória.

A Prof^a Maria Valdrinez Campana Lonardoni, pela orientação e amizade, toda minha gratidão e admiração. Obrigada pela confiança, aprendizado, esclarecimentos, pelas oportunidades e por sempre acreditar na minha capacidade.

À Prof^a. Thaís G. V. Silveira e a Prof^a. Sandra Alessi, pelas contribuições que fizeram a diferença na realização deste trabalho.

À Taísa, pela amizade sincera e companheirismo nos momentos mais difíceis, compreensão e ajuda, além de toda parceria durante a realização da parte experimental.

A Carmem, pela amizade verdadeira, pela companhia diária, conselhos e incentivo, por estar ao meu lado em todos os momentos.

À todos os amigos e colegas do Laboratório de Imunologia Clínica, que propiciaram o desenvolvimento deste trabalho, especialmente: Bruna, Carolina, Cissara, Laís, Izabel, Karin Marinete, Tatiane, Matheus.

Ao Prof. Noboru Hioka, pela colaboração e síntese das ftalocianinas utilizadas neste trabalho.

À todos os funcionários e professores do Laboratório Imunologia Clínica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia da Universidade Estadual de Maringá, por ter proporcionado a realização desta etapa da minha formação científica.

EPÍGRAFE

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos.”

Eleanor Roosevelt

Drogas fotossensíveis para o estudo da atividade anti *Leishmania* na terapia fotodinâmica

RESUMO

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e são um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Inúmeros fatores dificultam o tratamento, como efeitos adversos, baixa adesão do paciente ao tratamento e a resistência dos parasitos às drogas disponíveis, o que implica na necessidade de novos agentes terapêuticos. A fotólise de *Leishmania* é uma técnica promissora para o tratamento e dentre as drogas fotossensibilizadoras as ftalocianinas são candidatas para uso na terapia fotodinâmica. Este estudo teve como objetivo investigar a atividade de ftalocianinas fotossensíveis sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Para isso, as ftalocianina de alumínio-cloro (AlPcCl), ftalocianina de alumínio-hidróxido (AlPcOH) e ftalocianina de zinco (PcZn) e, como fonte de luz, um diodo emissor na região do vermelho do espectro eletromagnético (670-780 nm). As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram tratadas com AlPcCl (0,015 a 31,6 μM), ou AlPcOH (0,005 a 10,8 μM) ou PcZn (0,005 a 11,5 μM), na presença e na ausência de luz. A viabilidade dos parasitos foi avaliada após 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade para macrófagos J774.A1 e hemácias humanas também foi avaliada. Os resultados mostraram que *L. (L.) amazonensis* é altamente susceptível *in vitro* à citólise mediada pelas AlPcCl e AlPcOH na presença de luz, sem causar citotoxicidade para macrófagos J774.A1 e hemácias do tipo O. A concentração inibitória de 50% dos parasitos (IC_{50}) 24 h após a exposição à luz foi de 0,2 μM para AlPcCl e AlPcOH. A concentração citotóxica de 50% dos macrófagos J774.A1 (CC_{50}) > 31,6 μM para a AlPcCl e > 10,8 μM para a AlPcOH em 24 h. Após 48h e 72h de tratamento a IC_{50} para a AlPcCl e AlPcOH foi de 0,1 μM . Os índices de seletividade de (IS), mostram que a AlPcCl e a AlPcOH foram menos fototóxicas para as células J774.A1 do que para as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, com IS > 147,1 e > 43,7, respectivamente. A ftalocianina de zinco não apresentou atividade sobre as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os resultados obtidos reforçam a possibilidade de utilização das ftalocianinas de alumínio na terapia fotodinâmica para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea. Ftalocianinas. Fotólise. *Leishmania amazonensis*.

Citotoxicidade.

Photosensitive drugs for the study of anti *Leishmania* activity in photodynamic therapy

ABSTRACT

Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* and are a major public health problem worldwide. Several factors complicate the treatment, as adverse effects, poor adherence to treatment and the resistance of parasites available drugs, which implies the need for new therapeutic agents. *Leishmania* photolysis is a promising technique for the treatment and among photosensitizing drugs the phthalocyanine are candidates for use in photodynamic therapy. This study aimed to investigate the activity of the phthalocyanines photosensitive on promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. For this, have been studied chloro-aluminum phthalocyanine (AlPcCl), aluminum-hydroxide phthalocyanine (AlPcOH) and zinc phthalocyanine (PcZn) and as a light source an emitter diode in the red region of the electromagnetic spectrum (670- 780 nm). Promastigotes of *L. (L.) amazonensis* were cultured in AlPcCl concentrations (0.015 to 31.6 μM), AlPcOH (0.005 to 10.8 μM) and PcZn (0.005 to 11.5 μM) in the presence and in the absence light and viability of the parasites was evaluated after 24, 48 and 72 h. Cytotoxicity to human erythrocytes and J774.A1 macrophages was also evaluated. The results showed that *L. (L.) amazonensis* is highly susceptible in vitro to lysis mediated by AlPcCl and AlPcOH in the presence of light without causing cytotoxicity to J774.A1 macrophages and erythrocytes of type O. The inhibitory concentration of 50% the parasites (IC_{50}) after 24 h light exposure was 0.2 μM for AlPcCl and AlPcOH. The cytotoxic concentration of 50% the J774.A1 macrophages (CC_{50}) > 31.6 μM for AlPcCl and > 10.8 μM for AlPcOH in 24 h. In 48h and 72h after treatment the IC_{50} for AlPcCl and AlPcOH was 0.1 μM . The results of IS (selectivity index) show that AlPcCl and AlPcOH were less phototoxic to J774.A1 cells than for promastigotes of *L. (L.) amazonensis*, and the IS > 147.1 and > 43.7 respectively. The zinc phthalocyanine showed no activity on promastigotes of *L. (L.) amazonensis*. The results support the possibility of using the aluminum phthalocyanine in photodynamic therapy for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis. Phthalocyanines. Photolysis. *Leishmania amazonensis*. Cytotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO I

Figura 1	Manifestações clínicas da Leishmaniose	12
Figura 2	Classificação Taxonômica da <i>Leishmania</i>	13
Figura 3	Formas amastigotas (A) e promastigotas (B) de <i>Leishmania</i>	13
Figura 4	Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	14
Figura 5	Esquema de uma reação fotoquímica durante a TFD	17
Figura 6	Diagrama de Jablonski simplificado	18
Figura 7	Estrutura molecular das Ftalocianinas	20

CAPÍTULO II

Tabela 1	Valores de CC ₅₀ para macrófagos J774.A1, IC ₅₀ e IC ₉₀ para formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> e seus respectivos índices de seletividade (IS) 24h após a exposição à luz (LED)	44
Figura 1	Estruturas das ftalocianinas de Alumínio-cloro (AlPcCl), Alumínio-hidróxido (AlPcOH) e zinco (ZnPc)	45
Figura 2	Efeito do tratamento de formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> com a ftalocianina de alumínio cloro (AlPcCl) , na presença LED vermelho fosco (potência de 2,5-2,3 µW) ou ausencia de luz, em 24, 48 e 72 horas	46
Figura 3	Efeito do tratamento de formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> com a ftalocianina de alumínio hidróxido (AlPcOH), na presença LED vermelho fosco (potência de 2,5-2,3 µW) ou ausencia de luz, em 24, 48 e 72 horas	47
Figura 4	Efeito do tratamento de formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> com as AlPcCl (A) e AlPCOH (B) na presença LED vermelho fosco (potência de 2,5-2,3 µW) em 24, 48 e 72 horas	48
Figura 5	Fotossensibilidade de macrófagos J774.A1 com as AlPcCl (A) e AlPcOH (B) na presença LED vermelho fosco (potência de 2,5-2,3 µW) ou ausência de luz em 24 horas	49

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas das publicações científicas: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.

Disponível em: <http://aac.asm.org/>

SUMÁRIO

1	CAPÍTULO I.....	11
1.1	Leishmaniose.....	11
1.1.1	<i>Leishmania</i>	12
1.1.2	Diagnóstico.....	14
1.1.3	Tratamento.....	15
1.2	Terapia Fotodinâmica.....	16
1.2.1	Fotossensibilizadores.....	19
1.2.2	Ftalocianinas.....	20
1.2.3	Fontes de luz.....	21
1.3	Justificativa.....	21
1.4	Objetivos.....	21
1.4.1	Objetivo geral.....	21
1.4.2	Objetivos específicos.....	21
1.5	Referências.....	22
2	CAPÍTULO II.....	27
2.1	Efeito fototóxico das ftalocianinas de alumínio–cloro e alumínio–hidróxido sobre <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	28
3	CAPÍTULO III.....	50
3.1	Conclusões.....	50
3.2	Perspectivas futuras.....	50

CAPÍTULO I

LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, que acometem o homem e animais. Considerada de importância para a saúde pública, uma análise recente da Organização Mundial da Saúde (WHO), mostrou que mais de 98 países e territórios são endêmicos para leishmaniose, com mais de 350 milhões de pessoas em risco de transmissão. Globalmente, mais de 12 milhões de pessoas estão infectadas e estima-se que 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente ⁽¹⁾.

As leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas e estão diretamente ligadas à pobreza e fatores sociais, mas o ambiente e o clima influenciam diretamente a sua epidemiologia. As populações rurais e de baixa renda, e que não podem arcar com os altos custos dos tratamentos, são as mais afetadas ⁽¹⁾. Além disso, a ocorrência das formas mucosas, que causam deformidades, pode resultar em prejuízos psico-sociais e econômicos ⁽²⁾.

As manifestações clínicas variam de acordo com as espécies de *Leishmania*. A leishmaniose cutânea (LC), determinada por *L. (L.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, dentre outras, produz exclusivamente lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém, limitadas. Na leishmaniose mucocutânea ocorrem lesões nos tecidos cartilagosos da boca, nariz e garganta, e podem causar mutilações na região acometida ⁽³⁾. A leishmaniose cutânea difusa é caracterizada pela formação de múltiplos nódulos e placas, principalmente na região da face e nas partes externas das pernas e dos braços ^(4,2) e a espécie envolvida é a *L. (L.) amazonensis*. A leishmaniose visceral, causada por *L. (L.) chagasi*, é a forma mais severa da doença, afeta órgãos como fígado, baço e medula óssea e pode ser fatal se não tratada ⁽⁵⁾ (Figura 1).

Nas Américas, a LTA está presente em 18 países. No ano de 2012 foram registrados 52.919 casos, distribuídos em 16 países da região, sendo que a Venezuela e a Guiana Francesa não reportaram os dados. Do total de casos, 82,6% (43.798) estão concentrados no Brasil e nos países da sub-região Andina ⁽⁶⁾.

Segundo dados divulgados pelo Ministério da Saúde (MS), em março de 2014 houve uma redução dos casos de LC no Brasil, passando de 24.753 casos no ano de 1990 para 18.226 casos em 2013, sendo a região norte a que apresentou o maior número (8.407) e a região sul o menor número (296) de casos ⁽⁷⁾.

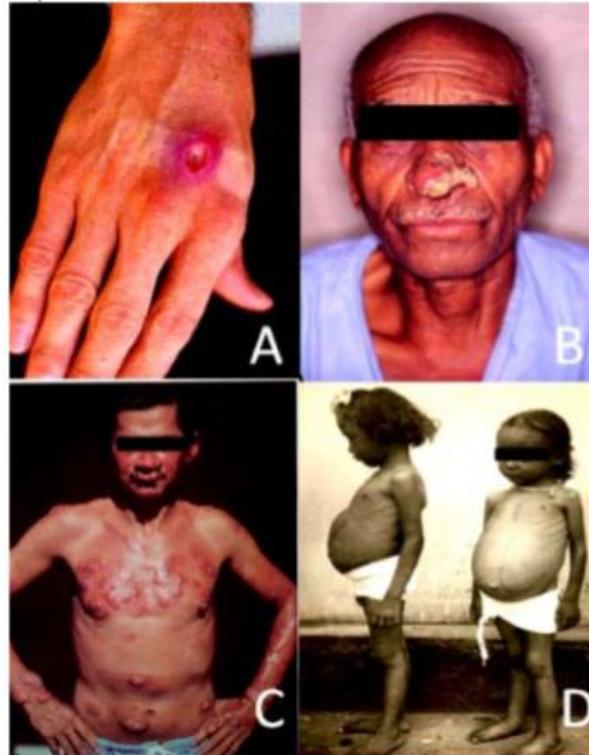


Figura 1: Manifestações clínicas da leishmaniose. A) Caso com ulceração recente e de bordas bem talhada no dorso da mão. B) Leishmaniose mucocutânea envolvendo nariz e lábio superior. C) Paciente com Leishmaniose cutânea difusa. D) Crianças de Sobral, CE, com leishmaniose visceral por *Leishmania infantum*. Fonte: Rey (2008).

LEISHMANIA

Os agentes causadores das leishmanioses humanas são protozoários da divisão *Kinetoplastea* (ordem Kinetoplastidae, família Trypanosomatidae) e gênero *Leishmania* ^(8, 9). A diferenciação das espécies de *Leishmania* é baseada em características genéticas, bioquímicas e imunológicas e os parasitos são agrupados em diferentes complexos. (Figura 2) ⁽¹⁾. No Brasil seis espécies de *Leishmania* já foram identificadas como causadoras da LC em humanos, sendo as principais *Leishmania (Viannia) brasiliensis*, *Leishmania (Leishmania) mexicana*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* ^(10, 11).

Estes protozoários são unicelulares e digenéticos, com um hospedeiro vertebrado e um invertebrado em seu ciclo biológico. Os hospedeiros vertebrados incluem mamíferos silvestres e domésticos ^(8, 9), nos quais apresenta a forma amastigota, que é intracelular e é fagocitada por macrófagos, onde se multiplica (Figura 3A). O hospedeiro invertebrado é um inseto vetor da subfamília Phlebotominae, que tem o seu trato digestório colonizado pela forma extracelular do parasito (Figura 3B).

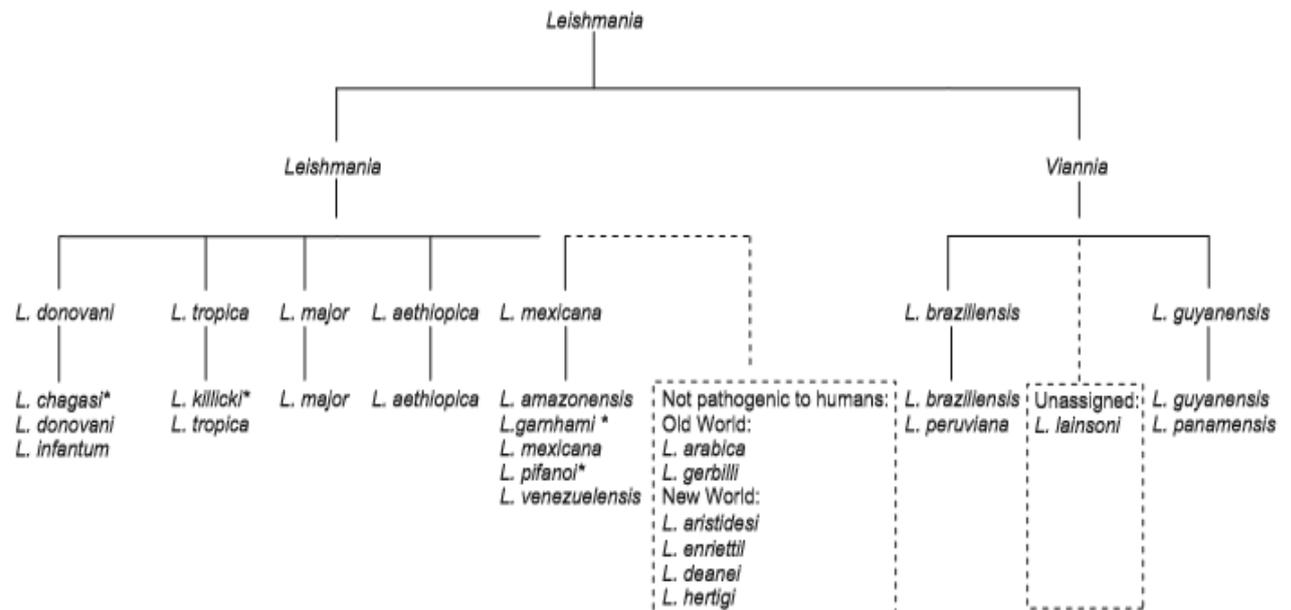


Figura 2: Classificação taxonômica da *Leishmania*. Fonte: Adaptado (WHO, 2010).

*Status da espécie está em discussão. *L. chagasi* no novo mundo é da mesma espécie que a *L. infantum*.

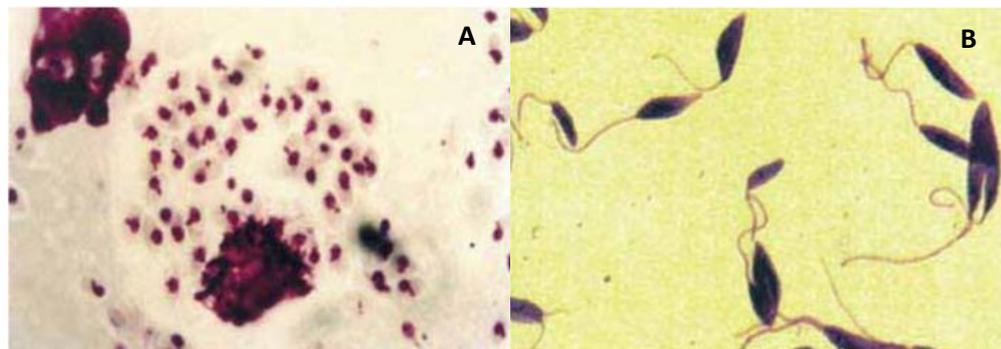


Figura 3: Formas amastigotas (A) e promastigotas (B) de *Leishmania*. Fonte: Brasil, Ministério da Saúde. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana, 2010.

As formas infectantes de *Leishmania*, que são transmitidas para o hospedeiro são chamadas metacíclicas⁽¹¹⁾. A infecção no inseto ocorre quando a fêmea do flebotomíneo pica o vertebrado para exercer o repasto sanguíneo e juntamente com o sangue ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas. Durante o trajeto pelo trato digestório anterior, ou ao chegarem no estômago, os macrófagos se rompem liberando as amastigotas, que sofrem divisão binária e se transformam rapidamente em promastigotas, que continuam se multiplicando no sangue ingerido, que é envolvido por uma membrana peritrófica secretada

pelas células do estômago do inseto. Após a digestão do sangue essa membrana se rompe e as formas promastigotas ficam livres ⁽⁹⁾ (Figura 4).

No intestino do inseto as formas promastigotas continuam se multiplicando, de forma a causar uma obstrução mecânica ou dificultar a ingestão de sangue pelo inseto. Quando o inseto tenta se alimentar, os músculos responsáveis pela sucção relaxam, e o inseto regurgita a promastigota em suas formas metacíclicas, sendo então inoculadas dentro da pele do hospedeiro ⁽⁸⁾. No homem, os parasitos são rapidamente internalizados pelos macrófagos, células dendríticas ou neutrófilos, localizando-se dentro dos fagolisossomos, transformando-se assim em amastigotas. Estas se dividem por fissão binária até ocupar todo o citoplasma e romper a membrana do macrófago, sendo assim liberadas no tecido e fagocitadas novamente, iniciando uma reação inflamatória local ^(8, 10) (Figura 4).

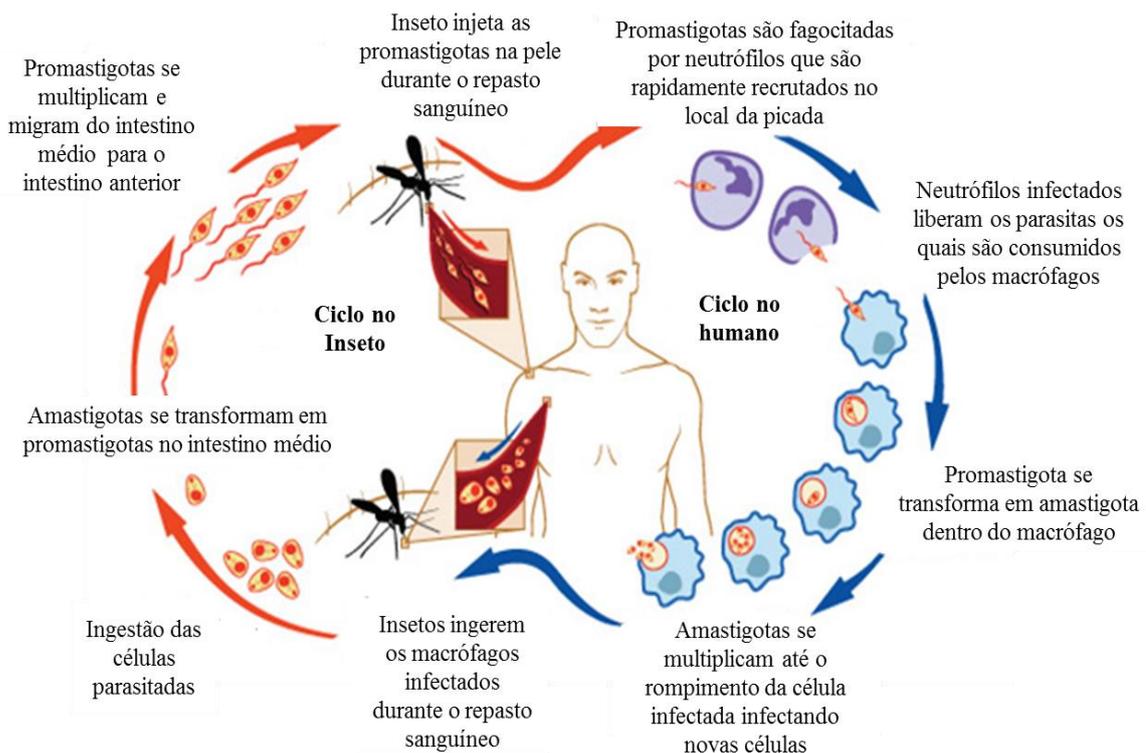


Figura 4: Ciclo de vida de *Leishmania*. Fonte: Adaptado de National Institute of Allergy and Infectious Diseases (Niaid. Nih. Gov, 2013). Disponível em: <http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/pages/lifecycle.aspx>.

DIAGNÓSTICO

O diagnóstico clínico da LC é baseado nas características das lesões apresentadas pelo paciente, associado à anamnese e ao estudo de dados epidemiológicos. O exame

parasitológico continua sendo o padrão de referência para o diagnóstico por causa da sua alta especificidade. A forma mais simples de diagnóstico é a pesquisa direta de formas amastigotas em material obtido da lesão por escarificação, aspiração ou biópsia da borda da lesão e corado por derivados de Romanowsky, Giemsa ou Leishman. O material obtido por qualquer um destes métodos pode ser usado para o exame microscópico, cultura e as técnicas de diagnóstico molecular ^(1, 10).

O diagnóstico sorológico é de uso limitado por causa da sua baixa sensibilidade e especificidade variável. O teste de Montenegro pode ser útil em estudos epidemiológicos, mas é de pouco valor no diagnóstico. Pode ser feito ainda a cultura de fragmentos do tecido ou de aspirados nos bordos da lesão e de linfonodos infartados nas áreas próximas a estas ^(1, 10).

Pacientes com lesões típicas nas mucosas e uma história de LC com uma ou mais cicatrizes visíveis ou, mais raramente, com LC concomitante são suspeitos de apresentar a doença. Uma sorologia positiva (por exemplo: Ensaio imunoenzimático (ELISA) ou imunofluorescência) ou um teste positivo para pesquisa direta de *Leishmania* aumenta a suspeita clínica. Os parasitos são escassos nas lesões mucosas devido a forte reação imunológica local, revelando a baixa sensibilidade para a pesquisa de parasitos em amostras de mucosa (obtido pela escovação ou biópsia) para exame microscópico ou cultura. A amplificação do DNA do parasito por técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR), tem se mostrado uma abordagem mais sensível para confirmar a leishmaniose mucosa ⁽¹⁾.

TRATAMENTO

As drogas de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses cutâneas e mucosas são os antimoniais pentavalentes (Sb+5), o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®), sendo este último não comercializado no Brasil. Com o objetivo de padronizar o esquema terapêutico, a OMS recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg Sb+5/kg/dia ⁽¹²⁾. Estes medicamentos foram introduzidos em 1945 e continuam sendo efetivos para algumas formas de leishmaniose. Contudo, são necessárias altas doses, apresentam elevada toxicidade, e o paciente precisa ser hospitalizado para a administração parenteral ⁽¹³⁾.

Não havendo resposta satisfatória com o tratamento pelo antimonial pentavalente, as drogas de segunda escolha são a anfotericina B e as pentamidinas (sulfato de pentamidina e mesilato de pentamidina) ⁽¹²⁾. Embora existam vários medicamentos antiparasitários, o

número de casos de leishmaniose não tem diminuído, já que muitas dessas drogas empregadas atualmente estão associadas com graves efeitos colaterais tóxicos e têm aumentando a resistência dos parasitos aos medicamentos normalmente prescritos ⁽¹⁴⁾.

Terapias alternativas têm sido pesquisadas e alguns estudos mostraram que a LC causada por várias espécies de *Leishmania sp* pode ser tratada por termoterapia, ^(15, 16) uma opção atraente, de baixo custo e bem tolerada. Porém, são necessários estudos clínicos mais avançados antes de ser recomendada como terapia de primeira linha. Outra opção é a crioterapia, que também apresenta as vantagens de boa tolerabilidade e baixo custo, e ainda estudos revelaram que sua eficácia é melhorada quando combinada com a terapia antimonial ^(17, 18).

O uso da terapia fotodinâmica (TFD) para o tratamento da LC é uma alternativa que têm mostrado efetividade ⁽¹⁹⁻²¹⁾. Estudos como os de Peli et al. (2011) ⁽²²⁾, que utilizaram o corante azul de metileno, e Gardner et al. (2010) ⁽²³⁾, utilizando acenaporfirinas, apresentaram resultados satisfatórios com o emprego da TFD no tratamento da leishmaniose. Akilov et al. (2009) ⁽²¹⁾ publicaram um estudo com o uso tópico do brometo 3,7-bis(di-n-butilamino) fenotiazinium para LC, apresentando ótimo resultado, com aplicações periódicas que diminuíram a carga parasitária, além de fornecer um bom resultado estético.

TERAPIA FOTODINÂMICA

A TFD é uma técnica cada vez mais utilizada para tratar uma série de doenças e distúrbios envolvendo diversos sistemas do organismo. Relatos antigos mostram que há mais de 4.000 anos os antigos egípcios usaram o extrato da planta *Amni majus* combinada com a luz solar para tratamento de vitiligo ⁽²⁴⁻²⁷⁾. Os gregos e indianos utilizaram as sementes de *Psoralea corylifolia* para o tratamento de psoríase e vitiligo, mas estas informações foram sendo perdidas durante séculos. Posteriormente, o efeito fototóxico sobre as células tumorais levou ao desenvolvimento da terapia fotodinâmica como uma ferramenta promissora no tratamento do câncer.

A primeira observação de sensibilização química do tecido pela luz foi descrita, em 1900, por Rabb ⁽²⁸⁾, seguida por muitos outros estudos. Em 1993 uma formulação contendo derivados diméricos e oligoméricos de hematoporfirina (Photofrin®) teve aprovação clínica e vem sendo utilizada em TFD, na oncologia e dermatologia. Desde então, um aumento no interesse da ação fotodinâmica de porfirinas surgiu em todo o mundo ⁽²⁸⁾.

As principais aplicações da TFD estão na oncologia, sendo as mais comuns aquelas contra queratoses actínicas, carcinoma basocelular nodular ou superficial e a doença de Bowen ⁽²⁹⁾. No entanto, existem outras indicações terapêuticas não-oncológicas, sendo também uma alternativa promissora para o tratamento da leishmaniose, pois, além de demonstrar resultados satisfatórios *in vitro* e *in vivo*, é uma técnica simples, não invasiva e não requer tecnologia de alto custo, o que é conveniente para o uso em países em desenvolvimento ⁽³⁰⁻³³⁾.

O procedimento requer três componentes essenciais: um fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz e oxigênio molecular. O FS é uma molécula que se localiza na célula e/ou tecido alvo e só pode ser ativado pela luz. Quando o FS é exposto a comprimentos de onda específicos, a absorção de fótons de luz resulta na transferência de energia para o FS, o qual se torna ativado passando de um "estado fundamental" para um "estado excitado" ⁽³⁴⁾. A excitação do FS, na presença de oxigênio, induz a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), que levam a citotoxicidade da célula e/ou tecido alvo ^(35,36,37) (Figura 5).

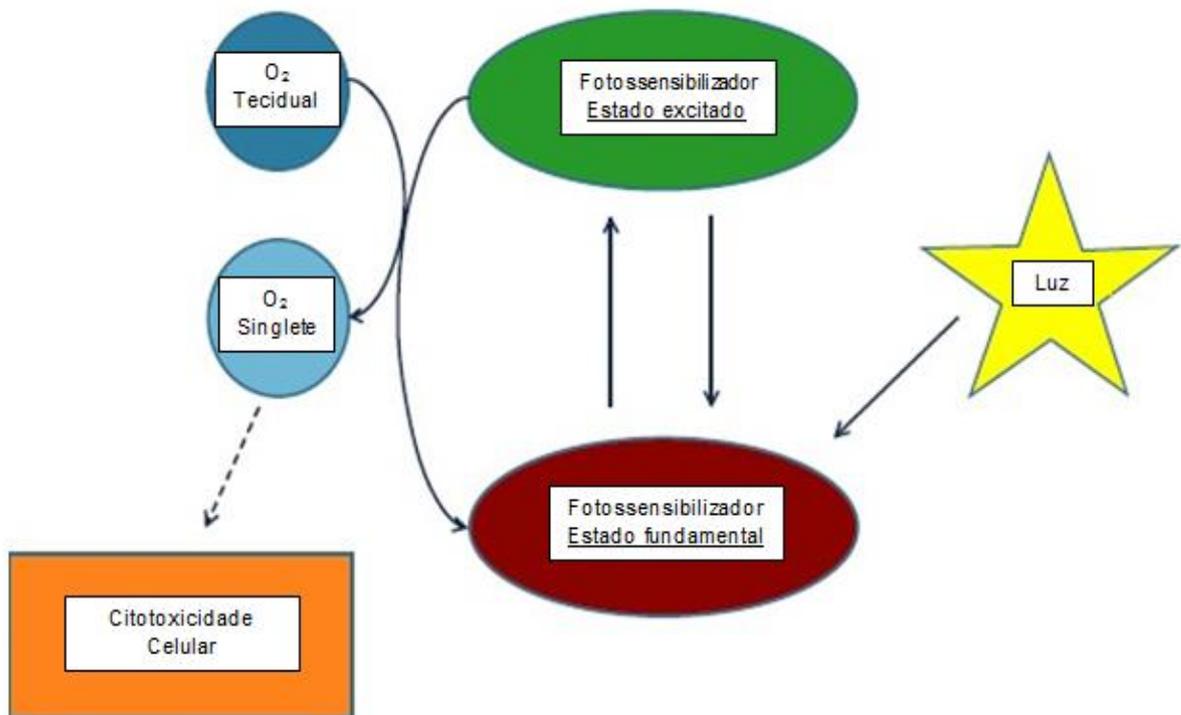


Figura 5: Esquema da reação fotoquímica durante a TFD (Adaptado: WAN, 2014).

As etapas fotofísicas e fotoquímicas envolvidas no processo de fotossensibilização do fármaco, após receber radiação visível que pode gerar espécies reativas capazes de promover a morte celular, podem ser explicadas pelo diagrama de Jablonski (Figura 6) onde uma

sequência de eventos radioativos e não radioativos desativam as moléculas fotossensibilizadoras que absorveram luz ⁽³⁷⁾.

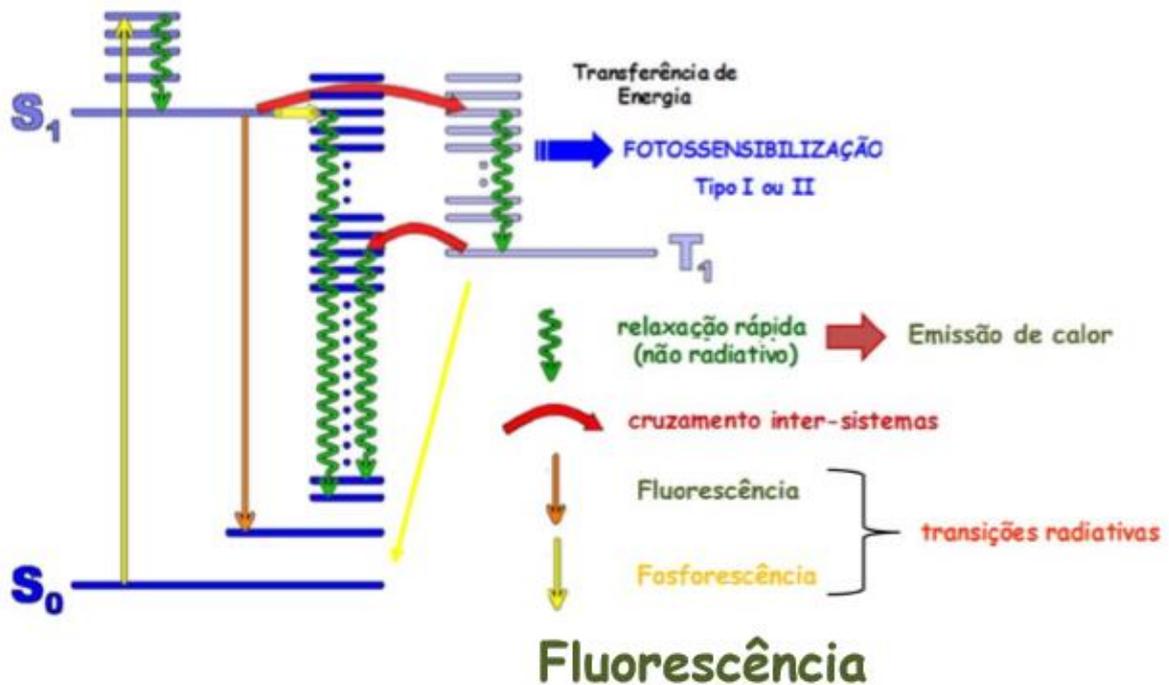


Figura 6: Diagrama de Jablonski simplificado. S_0 : estado singlete fundamental; S_1 : estado singlete excitado; T_1 : estado tripleto excitado; (Adaptado: PRIMO, 2009).

Após a absorção da luz, o FS que se encontrava no estado singlete fundamental (S_0) é excitado a um estado singlete de mais alta energia (S_1). No estado S_1 , este pode voltar ao seu estado fundamental por decaimento radioativo na forma de calor, por emissão de energia de forma radioativa (fluorescência) ou pode fazer um cruzamento intersistema, indo para o seu estado tripleto. No cruzamento intersistema, o FS passa para o mais baixo estado tripleto excitado (T_1). Neste estado, ele pode voltar para o seu estado fundamental através da emissão de energia de forma radioativa (fosforescência), ou transferir sua energia para o oxigênio tripleto, que se transforma no seu estado excitado singlete gerando as EROs. As EROs podem reagir com diferentes moléculas como: lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos desencadeando processos que levam a morte celular ^(23, 33).

Para que a TFD seja eficiente, em relação ao aspecto fotofísico, o FS deve ser fotoquimicamente ativo e com alta eficiência de absorção na porção do espectro que

compreende a faixa do vermelho ao infravermelho próximo (600-900 nm) ^(38, 39). Além disso, é fundamental utilizar FS que apresente as seguintes características, ditas ideais: não ser decomposto rapidamente pela absorção da luz visível; possuir alta afinidade e penetração no tecido doente em detrimento ao tecido saudável, fator este que é facilitado pelo aumento no grau de hidrofobicidade da molécula; ser fotodinamicamente eficiente na destruição do tecido sobre a ação de baixos níveis de luz visível ⁽⁴⁰⁾.

FOTOSSENSIBILIZADORES

Os FS são componentes indispensáveis para o êxito da TFD, pois possuem diferentes características que os tornam uma das peças chave para excelência da terapia. São moléculas com a propriedade especial de absorver energia luminosa, e com utilização desta mesma energia em reações químicas nas células e tecidos submetidos à terapia fotodinâmica ⁽⁴¹⁾.

Entre as características idealmente presentes nestes fototerápicos, está a pureza química, o acúmulo preferencial em tecidos alvos (lesados), a ativação em comprimento de onda específico, a capacidade de geração de elevadas quantidades de EROs, a rápida eliminação tecidual, minimizando danos a tecidos normais, e serem atóxicos sem a exposição luminosa. A função principal dos FS na TFD é a transição da energia luminosa para energia química, essencial para a geração das EROs ^(42, 43).

Existem diferentes tipos de FS e atualmente, um dos mais utilizados e aprovados clinicamente é um derivado da hematoporfirina, conhecido comercialmente como Photofrin®. Contudo, esses derivados, chamados de FS de primeira geração, apresentam algumas desvantagens para o uso na TFD, como prolongada fotossensibilidade cutânea, baixa seletividade ao tecido alvo e baixa absorção de luz na região do vermelho ⁽²⁸⁾.

Na tentativa de minimizar os problemas encontrados com os FS de primeira geração, tem-se buscado o desenvolvimento de novas moléculas, chamadas de FS de segunda geração, como as ftalocianinas, clorinas e bacterioclorinas ^(41, 44, 45). A segunda geração de FS possui absorção em comprimentos de onda maiores, períodos de fotossensibilização mais curtos e taxas de oxigênio singlete mais elevadas ⁽⁴⁶⁾. Outras características que os fazem melhores fármacos fotossensíveis são o seu elevado rendimento quântico na geração de oxigênio singlete, maior estabilidade química e física, atóxico na ausência de luz, alto grau de pureza química e redução de efeitos secundários ⁽⁴⁷⁾.

FTALOCIANINAS

As ftalocianinas (corantes sintéticos), conhecidas como FS de segunda geração, são lipofílicas, o que influencia em sua localização em membranas plasmáticas, microsossomos e mitocôndrias ^(48, 49). Contudo, por apresentarem baixa solubilidade em água, o seu uso em TFD é limitado, uma vez que impede a administração da mesma pela via intravenosa (meio fisiológico). Apesar disto, possuem propriedades fotofísicas vantajosas e diversos estudos demonstram seu potencial para a terapia fotodinâmica ^(36, 44, 50, 51). São pigmentos tetra-azoindólicos análogos às porfirinas, com forte absorção na região do vermelho do espectro eletromagnético (670- 780 nm), cuja estrutura molecular pode ser modificada inserindo-se ligantes periféricos e/ou axiais, bem como metais entre os quatro nitrogênios centrais ⁽³⁶⁾ (Figura 7).

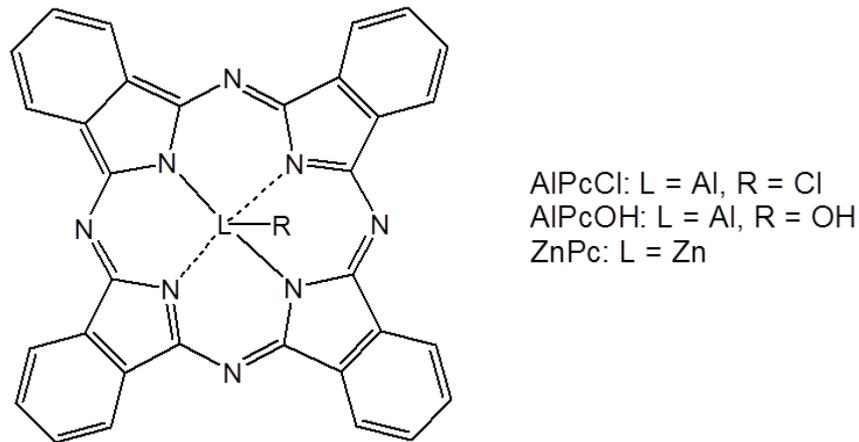


Figura 7: Estrutura molecular das Ftalocianinas

Até o momento, são poucos os estudos publicados envolvendo a TFD e as ftalocianinas como FS para o tratamento da leishmaniose. Contudo, os estudos disponíveis, tanto *in vitro* como *in vivo*, mostram que o tratamento da leishmaniose com essa combinação é promissor, visto que os resultados obtidos foram satisfatórios contra formas promastigotas e amastigotas em diferentes espécies de *Leishmania*. Dutta et al. (2005) ⁽³¹⁾ testaram a ftalocianina de alumínio cloro (AIPcCl) *in vitro* para o tratamento de LC, bem como Escobar et al. (2006) ⁽³²⁾ que testaram a ftalocianina de alumínio (AIPc) e a ftalocianina de zinco (ZnPc) em promastigotas *in vitro*, obtendo resultados em ambos os estudos.

FONTES DE LUZ

No tratamento fotodinâmico podem ser empregadas como fonte de luz os lasers, as lâmpadas de amplo espectro e lâmpadas de diodo (LED - Light Emitting Diode). As primeiras fontes de luz utilizada em quimioterapia fotodinâmica antimicrobiana foram as luzes não coerentes, que são seguras, possuem menor custo, seu espectro abrange vários fotossensibilizadores e podem ser utilizadas com filtros ópticos para selecionar um determinado comprimento de onda ⁽⁴⁹⁾.

Apesar de os lasers de baixa potência serem convencionalmente utilizados como fonte de irradiação na TFD, o uso do LED tem se fortalecido ⁽⁵²⁾. Este possui propriedades que resultam em bandas de emissão mais largas, beneficiando a agregação com o FS e a absorção de energia luminosa ⁽⁵³⁾.

JUSTIFICATIVA

Devido a ocorrência de novos casos de leishmaniose no Brasil e no mundo, a agressividade e limitações dos tratamentos convencionais, existe a necessidade de terapias mais seguras e simples e de baixo custo. Poucos estudos estão disponíveis sobre a atividade da TFD na LC, mas seu uso é uma proposta promissora para o tratamento deste agravo. Desta forma, são necessários estudos para definir as drogas mais adequadas quanto à toxicidade e à atividade em *Leishmania sp.*

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo investigar a eficácia da TDF sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, usando como substâncias fotossensibilizantes compostos do grupo das ftalocianinas e um diodo emissor de luz (LED) como fonte luminosa.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar *in vitro* a influência da variação da concentração das ftalocianinas na eficácia da terapia fotodinâmica.
- Avaliar o efeito citotóxico e fototóxico das ftalocianinas em hemácias humanas e em macrófagos da linhagem J774.A1 não infectados e infectados com *Leishmania amazonensis*.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO). Reports of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. Geneva, 2010. [Acesso em 13 de outubro de 2014]. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf.
2. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana.- 2º ed. Atual- Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.
3. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. Lancet. 2005;366(9496):1561-77.
4. Guimarães LH, Machado PRLA, Lessa HA, Argemiro Oliveira JR, Carvalho EM. Aspectos clínicos da leishmaniose tegumentar. Gazeta Médica da Bahia. 2005;75:66-74.
5. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral.- 1º ed. 5º reimpressão- Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2014.
6. Organização Pan Americana de Saúde/ Organização Mundial da Saúde (OPAS/OMS). World Health Day 2014: Small bites, big threat. Protect yourself and your environment from vector-borne disease. Brasília, 2014. [Acesso em 13 de outubro de 2014]. Disponível em <http://www.paho.org/world-health-day-2014/>
7. Brasil, Ministério da saúde. Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2013. Brasília, 2014. [Acesso em 15 de outubro de 2014]. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LT-Casos.pdf>
8. Rey, L. Parasitologia. 4º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 888p.
9. Neves, DP. Parasitologia Humana. 11º ed. São Paulo: Atheneu, 2005. 494p.
10. Gontijo B, Carvalho MdLRd. Leishmaniose tegumentar americana. Rev Soc Bras Med Trop. 2003;36(1):71-80.
11. Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD, Corbett CE. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol. 2009;31(8):423-31.
12. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2 ed. atualizada, 1.ª reimpressão Atual. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

13. Briones E, Colino CI, Lanao JM. Delivery systems to increase the selectivity of antibiotics in phagocytic cells. *J Control Release*. 2008;125(3):210-27.
14. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19(1):111-26.
15. Aronson NE, Wortmann GW, Byrne WR, Howard RS, Bernstein WB, Marovich MA, et al. A randomized controlled trial of local heat therapy versus intravenous sodium stibogluconate for the treatment of cutaneous *Leishmania major* infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(3):e628.
16. Ameen M. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: emerging therapies and progress in disease management. *Expert Opin Pharmacother*. 2010;11(4):557-69.
17. Asilian A, Sadeghinia A, Faghihi G, Momeni A. Comparative study of the efficacy of combined cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) vs. cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) alone for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 2004;43(4):281-3.
18. Salmanpour R, Razmavar MR, Abtahi N. Comparison of intralesional meglumine antimoniate, cryotherapy and their combination in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 2006;45(9):1115-6.
19. Asilian A, Davami M. Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *Clin Exp Dermatol*. 2006;31(5):634-7.
20. Akilov OE, Kosaka S, O'Riordan K, Hasan T. Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Exp Dermatol*. 2007;16(8):651-60.
21. Akilov OE, Yousaf W, Lukjan SX, Verma S, Hasan T. Optimization of topical photodynamic therapy with 3,7-bis(di-n-butylamino)phenothiazin-5-ium bromide for cutaneous leishmaniasis. *Lasers Surg Med*. 2009;41(5):358-65.
22. Peloi LS, Biondo CE, Kimura E, Politi MJ, Lonardoni MV, Aristides SM, et al. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: the efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Exp Parasitol*. 2011;128(4):353-6.
23. Gardner DM, Taylor VM, Cedeno DL, Padhee S, Robledo SM, Jones MA, et al. Association of acenaphthoporphyrins with liposomes for the photodynamic treatment of leishmaniasis. *Photochem Photobiol*. 2010;86(3):645-52.

24. Edelson RL. Light-activated drugs. *Sci Am.* 1988;259(2):68-75.
25. Sternberg ED, Dolphin D, Brückner C. Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron.* 1998;54:4151-4202.
26. Bonnett R, Martínez G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron.* 2001;57:9513-9547.
27. Allison RR, Mota HC, Sibata CH. Clinical PD/PDT in North America: An historical review. *Photodiagn Photodyn Ther.* 2004;1(4):263-277.
28. Ethirajan M, Chen Y, Joshi P, Pandey RK. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem Soc Rev.* 2011;40(1):340-62.
29. Fisher AMR, Murphree AL, Gomer CJ. Clinical and preclinical photodynamic therapy. *Lasers Surg Med.* 1995;17(1):2-31.
30. Akilov OE, Kosaka S, O'Riordan K, Hasan T. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem Photobiol Sci.* 2007;6(10):1067-75.
31. Dutta S, Ray D, Kolli BK, Chang KP. Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminum phthalocyanine chloride for photolysis *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49(11):4474-84.
32. Escobar P, Hernandez IP, Rueda CM, Martinez F, Paez E. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania* promastigotes. *Biomedica.* 2006;26 Suppl 1:49-56.
33. Dutta S, Ongarora BG, Li H, Vicente Mda G, Kolli BK, Chang KP. Intracellular targeting specificity of novel phthalocyanines assessed in a host-parasite model for developing potential photodynamic medicine. *PLoS One.* 2011;6(6):6.
34. Wan MT, Lin JY. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2014;7:145-63.
35. Baptista MS, Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. *Braz J Med Biol Res.* 2011;44(1):1-10.
36. Çamur M, Ahsen V, Durmuş M. The first comparison of photophysical and photochemical properties of non-ionic, ionic and zwitterionic gallium (III) and indium (III) phthalocyanines. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* 2011;219(2-3):217-27.
37. Primo FL. Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo *in vitro* de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em

nanoemulsão. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

38. Xu Y, Young MJ, Battaglini RA, Morse LR, Fontana CR, Pagonis TC, et al. Endodontic antimicrobial photodynamic therapy: safety assessment in mammalian cell cultures. *J Endod.* 2009;35(11):1567-72.
39. Farahi S, Montemezzani G, Grabar AA, Huignard J-P, Ramaz F. Photorefractive acousto-optic imaging in thick scattering media at 790 nm with a Sn(2)P(2)S(6): Te crystal. *Optics Letters.* 2010 Jun 1;35(11):1798-800.
40. De Paula CS, Tedesco AC, Primo FL, Vilela JM, Andrade MS, Mosqueira VC. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro. *Eur J Pharm Sci.* 2013;49(3):371-81.
41. Correa JC, Bagnato VS, Imasato H, Perussi JR. Previous illumination of a water soluble chlorine photosensitizer increases its cytotoxicity. *Laser Physics.* 2012;22(9):1387-94.
42. Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J, Berr F, Kiesslich T. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci.* 2009;24(2):259-68.
43. Berlanda N, Vercellini P, Fedele L. The outcomes of repeat surgery for recurrent symptomatic endometriosis. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2010;22(4):320-5.
44. Zhu Y-J, Huang J-D, Jiang X-J, Sun J-C. Novel silicon phthalocyanines axially modified by morpholine: Synthesis, complexation with serum protein and in vitro photodynamic activity. *Inorganic Chemistry Communications.* 2006;9(5):473-7.
45. Dabrowski JM, Arnaut LG, Pereira MM, Urbanska K, Simoes S, Stochel G, et al. Combined effects of singlet oxygen and hydroxyl radical in photodynamic therapy with photostable bacteriochlorins: evidence from intracellular fluorescence and increased photodynamic efficacy in vitro. *Free Radic Biol Med.* 2012;52(7):1188-200.
46. Karioti A, Bilia AR. Hypericins as potential leads for new therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2010;11(2):562-94.
47. O'Connor CM, Whellan DJ, Lee KL, Keteyian SJ, Cooper LS, Ellis SJ, et al. Efficacy and safety of exercise training in patients with chronic heart failure: HF-ACTION randomized controlled trial. *Jama.* 2009;301(14):1439-50.
48. Alexandratou E, Yova D, Loukas S. A confocal microscopy study of the very early cellular response to oxidative stress induced by zinc phthalocyanine sensitization. *Free Radic Biol Med.* 2005;39(9):1119-27.

49. Tomazini MV, Souza CdS, Garcia SB, Tedesco AC. Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinco tópica: avaliação da intensidade de fluorescência, absorção cutânea, alterações histológicas e imuno-histoquímicas na pele do modelo animal. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. 2007;82:535-41.
50. Horne TK, Abrahamse H, Cronje MJ. Investigating the efficiency of novel metallo-phthalocyanine PDT-induced cell death in MCF-7 breast cancer cells. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2012;9(3):215-24.
51. Zhao JF, Wang J, Chen JY, Chidawanykia W, Nyokong T, Ishii K, et al. Gallium phthalocyanine photosensitizers: carboxylation enhances the cellular uptake and improves the photodynamic therapy of cancers. *Anticancer Agents Med Chem*. 2012;12(6):604-10.
52. Giusti JS, Santos-Pinto L, Pizzolito AC, Helmersen K, Carvalho-Filho E, Kurachi C, et al. Antimicrobial photodynamic action on dentin using a light-emitting diode light source. *Photomed Laser Surg*. 2008;26(4):281-7.
53. Lima, JPM. Estudo in situ do efeito antimicrobiano da terapia fotodinâmica em lesões de cárie dentinária. 2009. 53 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2009.

CAPÍTULO II

**Artigo: “EFEITO FOTOTÓXICO DAS FTALOCIANINAS DE ALUMÍNIO-CLORO
E ALUMÍNIO-HIDRÓXIDO SOBRE *Leishmania (L.) amazonensis*”**

**EFEITO FOTOTÓXICO DAS FTALOCIANINAS DE ALUMÍNIO-CLORO E
ALUMÍNIO-HIDRÓXIDO SOBRE *Leishmania (L.) amazonensis***

**PHOTOTOXIC EFFECT OF ALUMINIUM-CHLORINE AND ALUMINIUM-
HYDROXIDE PHTHALOCYANINES ON *Leishmania (L.) amazonensis***

Nesi, V.^a, Navasconi T.R.^a, Silveira, T. G. V.^b, Aristides, S.M.A.^b, Hioka, N.^c Lonardoní, M.

V. C.^{b*}

Resumo

As leishmanioses são doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e são um importante problema de saúde pública em todo o mundo. Inúmeros fatores dificultam o tratamento, como efeitos adversos, baixa adesão do paciente ao tratamento e a resistência dos parasitos às drogas disponíveis, o que implica na necessidade de novos agentes terapêuticos. A fotólise de *Leishmania* é uma técnica promissora para o tratamento e dentre as drogas fotossensibilizadoras, as ftalocianinas são candidatas para uso na terapia fotodinâmica. Este estudo teve como objetivo investigar a atividade de ftalocianinas fotossensíveis sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Para isso, foram utilizadas as ftalocianinas de alumínio-cloro (AlPcCl), ftalocianina de alumínio-hidróxido (AlPcOH) e ftalocianina de zinco (PcZn) e, como fonte de luz, um diodo emissor na região do vermelho do espectro eletromagnético (670-780 nm). As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram tratadas com AlPcCl (0,015 a 31,6 µM), ou AlPcOH (0,005 a 10,8 µM) ou PcZn (0,005 a 11,5 µM), na presença e na ausência de luz. A viabilidade dos parasitos foi avaliada após 24, 48 e 72 h. A citotoxicidade para macrófagos J774.A1 e hemácias humanas também foi avaliada. Os resultados mostraram que *L. (L.) amazonensis* é altamente susceptível *in vitro* à citólise mediada pelas AlPcCl e AlPcOH na presença de luz, sem causar citotoxicidade para macrófagos J774. A1 e hemácias do tipo O. A concentração inibitória de 50% dos parasitos

(IC₅₀) 24 h após a exposição à luz foi de 0,2 µM para AlPcCl e AlPcOH. A concentração citotóxica de 50% dos macrófagos J774.A1 (CC₅₀) > 31,6 µM para a AlPcCl e > 10,8 µM para a AlPcOH em 24 h. Após 48h e 72h de tratamento a IC₅₀ para a AlPcCl e AlPcOH foi de 0,1 µM. Os índices de seletividade de (IS), mostram que a AlPcCl e a AlPcOH foram menos fototóxicas para as células J774.A1 do que para as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, com IS > 147,1 e > 43,7, respectivamente. A ftalocianina de zinco não apresentou atividade sobre as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*. Os resultados obtidos reforçam a possibilidade de utilização das ftalocianinas de alumínio na terapia fotodinâmica para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea Ftalocianinas. Fotólise. *Leishmania amazonensis*. Citotoxicidade.

Abstract

Leishmaniasis are diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* and are a major public health problem worldwide. Several factors complicate the treatment, as adverse effects, poor adherence to treatment and the resistance of parasites available drugs, which implies the need for new therapeutic agents. *Leishmania* photolysis is a promising technique for the treatment and among photosensitizing drugs the phthalocyanine are candidates for use in photodynamic therapy. This study aimed to investigate the activity of the phthalocyanines photosensitive on promastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. For this, have been studied chloro-aluminum phthalocyanine (AlPcCl), aluminum-hydroxide phthalocyanine (AlPcOH) and zinc phthalocyanine (PcZn) and as a light source an emitter diode in the red region of the electromagnetic spectrum (670- 780 nm). Promastigotes of *L. (L.) amazonensis* were cultured in AlPcCl concentrations (0.015 to 31.6 µM), AlPcOH (0.005 to 10.8 µM) and PcZn (0.005 to 11.5 µM) in the presence and in the absence light and viability of the parasites

was evaluated after 24, 48 and 72 h. Cytotoxicity to human erythrocytes and J774.A1 macrophages was also evaluated. The results showed that *L. (L.) amazonensis* is highly susceptible in vitro to lysis mediated by AlPcCl and AlPcOH in the presence of light without causing cytotoxicity to J774.A1 macrophages and erythrocytes of type O. The inhibitory concentration of 50% the parasites (IC50) after 24 h light exposure was 0.2 μM for AlPcCl and AlPcOH. The cytotoxic concentration of 50% the J774.A1 macrophages (CC50) > 31.6 μM for AlPcCl and > 10.8 μM for AlPcOH in 24 h. In 48h and 72h after treatment the IC50 for AlPcCl and AlPcOH was 0.1 μM . The results of IS (selectivity index) show that AlPcCl and AlPcOH were less phototoxic to J774.A1 cells than for promastigotes of *L. (L.) amazonensis*, and the IS > 147.1 and > 43.7 respectively. The zinc phthalocyanine showed no activity on promastigotes of *L. (L.) amazonensis*. The results support the possibility of using the aluminum phthalocyanine in photodynamic therapy for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Keywords: Cutaneous leishmaniasis. Phthalocyanines. Photolysis. *Leishmania amazonensis*.

Cytotoxicity.

^a Programa de Pós-Graduação em Biociências e Fisiopatologia, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá

^b Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Universidade Estadual de Maringá.

^c Departamento de Química - Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Maringá.

Endereço para correspondência: Prof.^a Dr.^a Maria Valdrinez Campana Lonardoni. Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina. Av. Colombo, 5790. CEP: 87020900 - Maringá, PR – Brasil. Telefone: (44) 30114878. Ramal: 4878 Fax: (44) 30114860. E-mail: mvclonardoni@gmail.com

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença crônica, causada por protozoários flagelados *Leishmania* da família *Trypanosomatidae*, que afeta a pele, mucosas e órgãos internos, Está amplamente distribuída em todo mundo e afeta homens e animais. Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), é uma doença endêmica em 98 países e territórios, com cerca de 350 milhões de pessoas em risco de contrair a infecção, mais de 12 milhões de pessoas infectadas e estima-se 1,3 milhões de novos casos e 20.000 a 30.000 mortes a cada ano ⁽¹⁾.

A doença pode ocorrer na forma cutânea e visceral. No continente americano a leishmaniose visceral (LV) é causada pela *Leishmania chagasi*, enquanto as espécies *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* são agentes etiológicos da leishmaniose cutânea (LC). A LC é uma doença polimorfa da pele e mucosas, provoca lesões ulceradas, nodulares, únicas ou múltiplas, e é transmitida pela picada de insetos denominados flebotomíneos ^(2,3).

Os antimoniais pentavalentes (N-metil-glucamina) são usados como primeira escolha para o tratamento. Porém, podem provocar efeitos colaterais graves e abandono do tratamento pelo paciente. Ocorrem também, casos em que não há cura. Com o elevado número de casos, tanto no Brasil como no mundo, terapias alternativas têm sido pesquisadas, tais como a utilização de imunoterapia e o uso da Terapia Fotodinâmica (TFD), que tem se mostrado efetivas no tratamento da LC ⁽⁴⁻⁶⁾.

A citólise de formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania sp* mediada por luz é uma nova técnica no tratamento da LC ⁽⁴⁻⁷⁾. Além disso, os efeitos colaterais da TFD são restritos ao desconforto gerado pelo calor durante a terapia, hiperpigmentação e eritema local ^(6, 8, 9).

O uso da luz como uma modalidade terapêutica ganhou forte impulso recentemente devido ao desenvolvimento de fontes de luz eficientes e acessíveis. Conseqüentemente, as drogas ativadas pela luz (fotossensibilizadores - FS) desempenham um papel chave neste processo, sendo a peça principal no desenvolvimento de novos medicamentos para tratar várias doenças, tais como câncer, infecções microbianas e doenças tropicais. No entanto, o aumento da eficiência de FS utilizando a TFD permanece um desafio ⁽¹⁰⁻¹²⁾. Como fotossensibilizadores de segunda geração, as ftalocianinas são fortes candidatas a utilização em TFD, pois além de possuírem propriedades fotofísicas vantajosas, e diversos estudos demonstram seu potencial para a TFD ⁽¹³⁻¹⁵⁾.

O tratamento da LC é dificultado pelos efeitos colaterais e pela resistência do parasito aos medicamentos disponíveis, o que pode levar ao desenvolvimento da forma mucosa e a deformidades e sequelas. Assim, torna-se necessário a busca de novos agentes terapêuticos que ofereçam maior segurança e eficácia, com um custo acessível para o tratamento. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar a eficácia da TDF sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, usando como substâncias fotossensibilizantes compostos do grupo das ftalocianinas e um diodo emissor de luz (LED) como fonte luminosa.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo das Ftalocianinas: Foram avaliados três componentes deste grupo (Figura 1): ftalocianina de alumínio-cloro (AlPcCl) (Acros Organics[®], Germany), ftalocianina de alumínio-hidróxido (AlPcOH) (Sigma-Aldrich[®] Inc., USA) e ftalocianina de zinco (PcZn) (Sigma-Aldrich[®] Inc.,EUA), com graus de pureza de 98%, 85% e 97%, respectivamente. As soluções estoques foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma[®], St Louis, EUA) e armazenadas no escuro à temperatura ambiente. No momento do uso, as soluções estoques foram incubadas durante 1 hora no ultrassom, a fim de minimizar ao máximo a formação de

agregados, A seguir, foram centrifugadas (2500 rpm por 10 min). O sobrenadante foi diluído 8 vezes em meio de cultura RPMI 1640 pH 6,8 (Gibco[®], New York, EUA). A concentração final de DMSO foi 6,25%, quando não mais apresenta toxicidade para as células. Nesta solução a concentração de cada ftalocianina foi determinada através de análise espectrofotométrica. Para isso, o espectro ultravioleta visível (UV-Vis) foi determinado na região de 670 nm e a concentração final da solução estoque foi determinada segundo a lei de Lambert-Beer.

Cultura e manutenção de *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis* foi mantida pela inoculação de 1×10^6 parasitos nas patas posteriores de camundongos BALB c. Após 30 a 40 dias os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e retirados fragmentos de gânglios, que foram inoculados em meio de cultura 199 (Gibco[®]), suplementado com soro bovino fetal (SBF) 10% (v/v), 1% de urina humana, 20 mM de L-glutamina e antibióticos (100 UI/mL de penicilina e 0,1 mg/mL de estreptomicina), e incubados a 25°C. Os parasitos foram mantidos por repiques semanais.

Ensaio leishmanicida com promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*: Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas até a fase log de crescimento em meio RPMI 1640 pH 6,8 suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF) (Gibco[®], New York, EUA), e 20 mM de L- glutamina, a 25°C. As culturas foram centrifugadas a 2500 rpm por 10 minutos, ressuspensas em meio de cultura na concentração de 4×10^6 células/ml e foram distribuídos 100 µL por poço, em placas de 96 poços. As ftalocianinas foram adicionadas em 12 diferentes concentrações: AlPcCl (0,015-31,6 µM) e AlPcOH (0,005-10,8 µM) e ZnPc (0,005-11,5 µM), e as placas foram incubadas com as ftalocianinas por 30 minutos. Logo após, uma placa permaneceu na ausência de luz e a outra foi iluminada com LED vermelho fosco (potência de 2,5 -2,3 µW e comprimento de onda 630 nm) por 30 minutos. Em seguida, ambas as placas foram incubadas a 25°C por mais 24, 48 e 72 horas. A

seguir a viabilidade dos parasitos foi determinada pelo método colorimétrico do XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida) e a porcentagem de inibição foi estimada por comparação com as culturas controles não tratadas. A razão concentração inibitória de 50% (IC₅₀) e a concentração inibitória de 90% (IC₉₀) foram calculadas por análise de regressão polinomial. Todos os testes foram realizados ao menos três vezes e em triplicata, usando a anfotericina B (Anfotericin B[®]-Cristália) como controle positivo.

Citotoxicidade para macrófagos J774.A1: Os macrófagos foram cultivados em meio RPMI 1640 (Gibco, New York, EUA) pH 7,6, suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco, New York, EUA), 100 UI/mL de penicilina G (Sigma[®], St Louis, USA) e 0,1 mg/mL de estreptomicina (Sigma[®], St Louis, USA). Depois foram centrifugados (2500 rpm, 10 minutos) e a seguir distribuídos em placas de cultura de 96 poços (5x10⁴/ml) e incubados por 48 horas em estufa de CO₂ a 37°C. Posteriormente as ftalocianinas foram adicionadas em diferentes concentrações: AlPcCl (0,015-31,6 µM) e AlPcOH (0,005-10,8 µM), e as placas foram incubadas por 30 minutos. Em seguida, as placas foram incubadas por mais 30 minutos na presença ou ausência de luz. Após, as placas foram mantidas por 24 horas em estufa de CO₂ a 37°C. A seguir a viabilidade dos macrófagos foi determinada pelo método colorimétrico do XTT. Após incubação por 3 horas em estufa de CO₂ a 37°C, protegido da luz, foi realizada a leitura em leitora de microplacas (Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Áustria) a 450 nm e 620 nm. Os valores de concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) foram calculados por análise de regressão polinomial. O índice de seletividade (IS) foi calculado por meio da razão CC₅₀/ IC₅₀.

Determinação da Atividade Hemolítica: Para a avaliação da atividade hemolítica foi preparada uma suspensão de hemácias humanas tipo O a 6% em solução salina glicosada (1% glicose e 0,9% de NaCl). O teste foi realizado em placas de 96 poços, onde cada ftalocianina foi diluída: AlPcCl (0,015-31,6 µM) e AlPcOH (0,005-10,8 µM) e ZnPc (0,005-11,5 µM). A

seguir, foram adicionados 100 µL da suspensão de hemácias (6%). Depois de 30 minutos de incubação com a ftalocianina uma das placas foi iluminada por 30 minutos. Em seguida ambas as placas foram mantidas em estufa a 37°C, por 2 horas e centrifugadas a 1100 rpm por 3 minutos (Rotina 420 Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Germany). O sobrenadante foi transferido para nova placa e a leitura realizada a 550 nm em leitora de microplaca (Asys Hitech GMBH, Eugendorf, Áustria). Os resultados foram expressos como porcentagem de hemólise e calculados pela equação de hemólise: $(\%) = 100 - [(A_p - A_s)/(A_p - A_c)]$, na qual A_p , A_s e A_c são as absorbâncias do controle positivo, da amostra teste e do controle negativo, respectivamente. A anfotericina B foi utilizada como droga de referência, Triton X-100 a 4% (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) como controle positivo de hemólise e a suspensão de hemácias sem adição de nenhum dos compostos foi usada como controle negativo.

Análise estatística: Os dados obtidos foram digitados em planilha do programa Microsoft Excel 2010 e analisados estatisticamente com o auxílio do *Software R.3.1.1*. Foi realizada a avaliação de médias e os desvios padrão para as variáveis, seguido do teste de *Mann-Whitney* quando havia dois grupos para comparação de dados não pareados. O nível de significância adotado nos testes foi de 5%, ou seja, foram consideradas significativas as associações cujo $p < 0,05$.

RESULTADOS

Todas as ftalocianinas (figura 1) foram avaliadas em 12 concentrações diferentes, AlPcCl (0,015- 31,6 µM), AlPcOH (0,005- 10,8 µM) e PcZn (0,005-11,5 µM). As promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram altamente fotossensíveis para o tratamento com a AlPcCl e AlPcOH, sendo que IC_{50} , 24 h após a exposição à luz foi de 0,2 µM para ambas as ftalocianinas. A PcZn não mostrou atividade leishmanicida após a exposição à luz nas concentrações analisadas. O valor da CC_{50} pra os macrófagos J774.A1 foi superior a 31,6 µM

para a AlPcCl e superior a 10,8 μM para a AlPcOH em 24 h (Tabela 1). Em 48 h e 72 h após o tratamento a IC_{50} para a AlPcCl e AlPcOH foi de 0,1 μM .

A citotoxicidade para os macrófagos J774.A1 e os parasitos foi comparada utilizando o índice de seletividade (IS), que consiste na razão entre a concentração citotóxica 50% (CC_{50}) para células J774.A1 e IC_{50} para parasitos. Os resultados de IS apresentados na tabela 1 mostram que a AlPcCl e a AlPcOH foram menos fototóxicas para as células J774.A1 do que para as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, com IS maior 147,1 e maior que 43,7, respectivamente. Portanto, os resultados do presente estudo demonstram que as ftalocianinas referidas apresentam atividade leishmanicida expressiva. Em contraste, em culturas nas mesmas condições, porém na ausência de luz, não observamos atividade para nenhuma das ftalocianinas analisadas nas referidas concentrações.

Na figura 2 podemos observar a percentagem de morte de formas promastigotas de *L. amazonensis* de acordo com as concentrações da AlPcCl na presença e na ausência de luz, em 24, 48 e 72 horas. Quando comparadas a percentagem de morte na presença de luz e na ausência de luz, diferenças estatisticamente significativas foram observados nas concentrações de 31,643 μM a 0,494 μM em 24 horas, 31,643 μM a 0,123 μM em 48 horas e 31,643 μM a 0,247 μM em 72 horas após os tratamentos. Portanto, nestas concentrações a AlPcCl na presença de luz, apresentou maior fototoxicidade para as formas promastigotas.

Diferenças significativas também foram observadas quando comparados a percentagem de morte das formas promastigotas iluminadas em relação ao controle nas concentrações de 24, 48 e 72 horas, sendo de 31,643 μM a 0,494 μM , 31,643 μM a 0,062 μM e 31,643 μM a 0,247 μM , respectivamente (figura 2).

Na figura 3 podemos observar a percentagem de morte de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* de acordo com as concentrações da AlPcOH na presença e na

ausência de luz, em 24, 48 e 72 horas. Quando comparada a percentagem de morte das formas promastigotas na presença de luz com a ausência de luz e controle, diferenças estatisticamente significativas foram observados nas concentrações de 10,812 μM a 0,337 μM em 24 h, 10,812 μM a 0,168 μM em 48 h e 72 h após os tratamentos. Portanto, nestas concentrações a AlPcOH na presença de luz, apresentou maior toxicidade para as formas promastigotas.

O tempo de incubação das formas promastigotas com a AlPcCl e AlPcOH não influenciou na percentagem de morte para nenhuma das concentrações que causaram 50% ou mais de inibição de promastigotas em cultura, exceto para a AlPcCl na concentração de 0,247 μM , onde houve diferença estatisticamente significativa quando comparamos a percentagem de morte no tempo de 24 h em relação aos tempos de 48 h ($p= 0,03$) e 72 h ($p= 0,02$) (Figura 4).

As ftalocianinas de AlPcCl e AlPcOH não apresentaram citotoxicidade para macrófagos J774.A1 nas concentrações ativas (50% ou mais de inibição) contra formas promastigotas na presença de luz. Além disso, não houve diferenças estatisticamente significativas para a citotoxicidade com as AlPcCl (A) e AlPcOH (B) na maioria das concentrações avaliadas, em relação a presença ou ausência de luz, exceto para a maior concentração de cada FS, onde ambos foram fototóxicos na ausência de luz, com percentagem de morte acima de 50% (Figura 5).

A toxicidade das ftalocianinas sobre hemácias humanas foi avaliada após a incubação a 37°C por 2 horas. A porcentagem de hemólise com e sem iluminação para as três Pcs em todas as concentrações avaliadas foi inferior a 4%, sendo que a maior taxa de hemólise foi observada para a AlPcCl na presença de luz (3,8%).

DISCUSSÃO

O tratamento da LTA ainda é um desafio a ser superado. Neste contexto vários estudos mostram que TFD é uma alternativa promissora para o tratamento, pois apresenta resultados satisfatórios quando utilizada para a atividade anti *Leishmania* ⁽¹⁶⁻¹⁸⁾.

Este trabalho demonstrou o efeito fototóxico das AlPcCl e AlPcOH contra formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, e que não apresentou citotoxicidade para os macrófagos J774.A1 nas concentrações capazes de inibir 50% do número de parasitos viáveis. Resultados semelhantes foram demonstrados por Escobar e col. (2006) ⁽¹⁹⁾, com *L. panamensis* e *L. chagasi* usando a ftalocianina de alumínio (AlPc) e a ftalocianina de zinco (ZnPc) como FS para reduzir a viabilidade celular e inibir o crescimento *in vitro*. A ftalocianina de alumínio cloro (AlPcCl) nas concentrações 0 a 10 ug/ml também foi fototóxica para formas intracelulares e extracelulares de *Leishmania (L.) amazonensis*, quando irradiados com 3,6 J/cm², não tendo efeito sobre os parasitos ou macrófagos quando não irradiadas ⁽¹⁶⁾.

Os efeitos fototóxicos contra as formas promastigotas dependem de fatores como: tipo da ftalocianina, concentração e carga, bem como as espécies de *Leishmania* ⁽⁸⁾. Neste estudo, a *Leishmania amazonensis* apresentou sensibilidade semelhante aos efeitos tóxicos das AlPcCl e AlPcOH, sendo que ambas apresentaram a mesma IC₅₀: 0,2 µM no tempo de 24 horas e 0,1 µM nos tempos de 48 e 72 horas, quando iluminadas.

Um estudo utilizando a ftalocianina de alumínio tetrasulfonada (AlPcS₄) contra as espécies *Leishmania major* e *Leishmania brasiliensis*, também mostrou uma redução significativa de parasitos viáveis em relação aos controles, onde a TFD mais eficaz foi obtida com AlPcS₄ a 10,0 µM e 10 J/cm², sendo a *Leishmania brasiliensis* a que apresentou a maior taxa de mortalidade após o tratamento ⁽²⁰⁾.

Dutta et al. também publicou um estudo que descreve a utilização de uma combinação de uroporfirina e a AlPcCl em *Leishmania (L.) amazonensis*. Foi avaliada a associação de ambas as drogas em formas promastigotas com e sem irradiação com luz vermelha. Os resultados mostraram fotólise dos parasitos irradiados com ambos os FS ao passo que os parasitos não irradiados não mostraram nenhum dano ⁽²¹⁾.

Até o momento este é primeiro relato da atividade leishmanicida da AlPcOH, que apresentou-se como um potente inibidor de *Leishmania*, mesmo em baixas concentrações, sem causar citotoxicidade aos macrófagos. É notável no presente estudo o fato de a atividade leishmanicida ocorrer em baixas concentrações de AlPcCl e de AlPcOH em relação às condições necessárias para lisar macrófagos J774.A1, como demonstrado através do IS.

Não observamos atividade da ZnPc, em nenhum dos tempos avaliados. No entanto, num estudo com 17 diferentes Pcs (13 ftalocianinas de zinco e 4 de silício), uma delas, nas concentrações de 10 e 100 μM , foi 20-50 vezes mais ativa contra *Leishmania (L.) amazonensis* do que para macrófagos ⁽¹⁷⁾. Esta diferença pode ser explicada pelo fato da estrutura molecular da ZnPc que apresentou atividade, diferir daquela avaliada em nosso estudo, já que a partir da estrutura base é possível adicionar diferentes radicais. Outros dois pontos importantes a serem destacados são as divergências entre os tempos de exposição à luz, e também em relação às fontes e intensidades da luz utilizadas.

Mudanças no sistema de entrega do FS também podem influenciar na ação fotodinâmica. Hernández et al ⁽²²⁾ publicou outro estudo que comparou a AlPcCl encapsulada em lipossomos e livre em solução. Os experimentos foram realizados com duas espécies de *Leishmania* do Novo Mundo, nas formas promastigotas e amastigotas e em células THP1. O experimento tentou verificar a capacidade do FS em alcançar a *Leishmania* dentro da célula hospedeira THP1. De acordo com os autores, o FS encapsulado em lipossomos era quase 10

vezes mais fotoativo do que a forma livre em células THP1, bem como em formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania chagasi* e *Leishmania panamensis*. Portanto, o FS não foi seletivo para as formas amastigotas intracelulares.

Vale ressaltar que neste estudo utilizou-se como fonte de iluminação as lâmpadas de diodo emissor de luz (LED). Este é um ponto importante, pois estas lâmpadas mostram-se eficientes para fotoativar as ftalocianinas e apresentam baixo custo, o que viabiliza o seu uso em larga escala ⁽²³⁾.

A terapia fotodinâmica revelou-se como uma estratégia promissora para o tratamento da leishmaniose. Os resultados apresentados neste estudo reforçam a possibilidade de utilização da terapia fotodinâmica no tratamento da leishmaniose tegumentar americana, os quais mostraram que a terapia fotodinâmica associada à fotossensibilizadores do grupo das ftalocianinas na presença de luz LED tem potente atividade sobre as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

REFERÊNCIAS

1. **WHO. World Health Organization.** 2010. Reports of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis, p. 104, Geneva.
2. **Brasil, Ministério da Saúde.** 2007. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. *In* Saúde. SdVe (ed.), 2º ed. Editora do Ministério da Saúde, Brasília.
3. **Lessa M. M., Lessa H. A., Castro T. W. N, Oliveira A., Scherifer A., Machado P., Carvalho E. M.** 2007. Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Revista Brasileira de Otorrinolaringologia* **73**:843-847.
4. **Asilian A., Davami M.** 2006. Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial, p. 634-637, *Clin Exp Dermatol*, vol. 31, England.
5. **Akilov O. E, Yousaf W., Lukjan S. X., Verma S., Hasan T.** 2009. Optimization of topical photodynamic therapy with 3,7-bis(di-n-butylamino)phenothiazin-5-ium bromide for cutaneous leishmaniasis. *Lasers Surg Med* **41**:358-365.
6. **Akilov O. E, Kosaka S., O'Riordan K., Hasan T.** 2007. Parasitocidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells, p. 651-660, *Exp Dermatol*, vol. 16, Denmark.
7. **Lee Y., Baron E. D.** 2011. Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology, p. 199-209, *Semin Cutan Med Surg*, vol. 30. Published by Elsevier Inc., United States.
8. **Akilov O. E, Kosaka S., O'Riordan K., Song X., Sherwood M., Flotte T.J., Foley J.W., Hasan T.** 2006. The role of photosensitizer molecular charge and structure on

- the efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites, p. 839-847, Chem Biol, vol. 13, England.
9. **Enk C. D., Fritsch C., Jonas F., Nasereddin A., Ingber A., Jaffe C. L., Ruzicka T.** 2003. Treatment of cutaneous leishmaniasis with photodynamic therapy, p. 432-434, Arch Dermatol, vol. 139, United States.
 10. **Van der Snoek E. M, Robinson D. J, van Hellemond J. J, Neumann H. A.** 2008. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. J Eur Acad Dermatol Venereol **22**:918-922.
 11. **Demidova T. N, Hamblin M. R.** 2004. Photodynamic therapy targeted to pathogens. Int J Immunopathol Pharmacol **17**:245-254.
 12. **Tardivo J. P., Del Giglio A., de Oliveira C. S, Gabrielli D. S, Junqueira H. C, Tada D. B, Severino D., de Fátima Turchiello R., Baptista M. S.** 2005. Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy **2**:175-191.
 13. **Çamur M., Ahsen V., Durmuş M.** 2011. The first comparison of photophysical and photochemical properties of non-ionic, ionic and zwitterionic gallium (III) and indium (III) phthalocyanines. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry **219**:217-227.
 14. **Horne T. K, Abrahamse H., Cronje M. J.** 2012. Investigating the efficiency of novel metallo-phthalocyanine PDT-induced cell death in MCF-7 breast cancer cells. Photodiagnosis Photodyn Ther **9**:215-224.
 15. **Zhao J. F, Wang J., Chen J. Y, Chidawanykia W., Nyokong T., Ishii K., Kobayashi N.** 2012. Gallium phthalocyanine photosensitizers: carboxylation enhances the cellular uptake and improves the photodynamic therapy of cancers. Anticancer Agents Med Chem **12**:604-610.

16. **Dutta S., Ray D., Kolli B. K, Chang K. P.** 2005. Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminum phthalocyanine chloride for photolysis in vitro, p. 4474-4484, Antimicrob Agents Chemother, vol. 49, United States.
17. **Dutta S., Ongarora B. G, Li H., Vicente Mda G., Kolli B. K, Chang K. P.** 2011. Intracellular targeting specificity of novel phthalocyanines assessed in a host-parasite model for developing potential photodynamic medicine. PLoS One **6**:6.
18. **Peloi L. S, Biondo C. E, Kimura E., Politi M. J, Lonardonni M. V, Aristides S. M, Dorea R. C, Hioka N., Silveira T. G.** 2011. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: the efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, p. 353-356, Exp Parasitol, vol. 128. 2011 Elsevier Inc, United States.
19. **Escobar P., Hernandez I. P, Rueda C. M, Martinez F., Paez E.** 2006. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania* promastigotes. Biomedica **26 Suppl 1**:49-56.
20. **Pinto G., Soares C. P, Mittmann J.** 2011. Assessment of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis* promastigote viability after photodynamic treatment with aluminum phthalocyanine tetrasulfonate (AlPcS₄). J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis **17**: 300-307.
21. **Dutta S., Waki K., Chang K. P.** 2012. Combinational sensitization of *Leishmania* with uroporphyrin and aluminum phthalocyanine synergistically enhances their photodynamic inactivation *in vitro* and *in vivo*. Photochem Photobiol **88**:620-625.
22. **Hernandez I. P, Montanari J., Valdivieso W., Morilla M. J., Romero E. L., Escobar P.** 2012. *In vitro* phototoxicity of ultradeformable liposomes containing chloro aluminum.

Tabela 1. Valores de CC_{50} para macrófagos J774.A1, IC_{50} e IC_{90} para formas promastigotas e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e seus respectivos índices de seletividade (IS) 24h após a exposição à luz (LED)

Ftalocianinas (μM)	IC_{50}	IC_{90}	CC_{50}	IS
ALPCCL	0,2	2,1	> 31, 6	> 147,1
ALPCOH	0,2	2,2	>10, 8	> 43,7
ZNPC	> 11,5	> 11,5	-	-

IC_{50} e IC_{90} =Concentração capaz de inibir 50% e 90% de *L. (L.) amazonensis* em cultura;
 CC_{50} = Concentração citotóxica para 50% de macrófagos J774. A1; IS= Índice de Seletividade dado pela razão CC_{50}/IC_{50} .

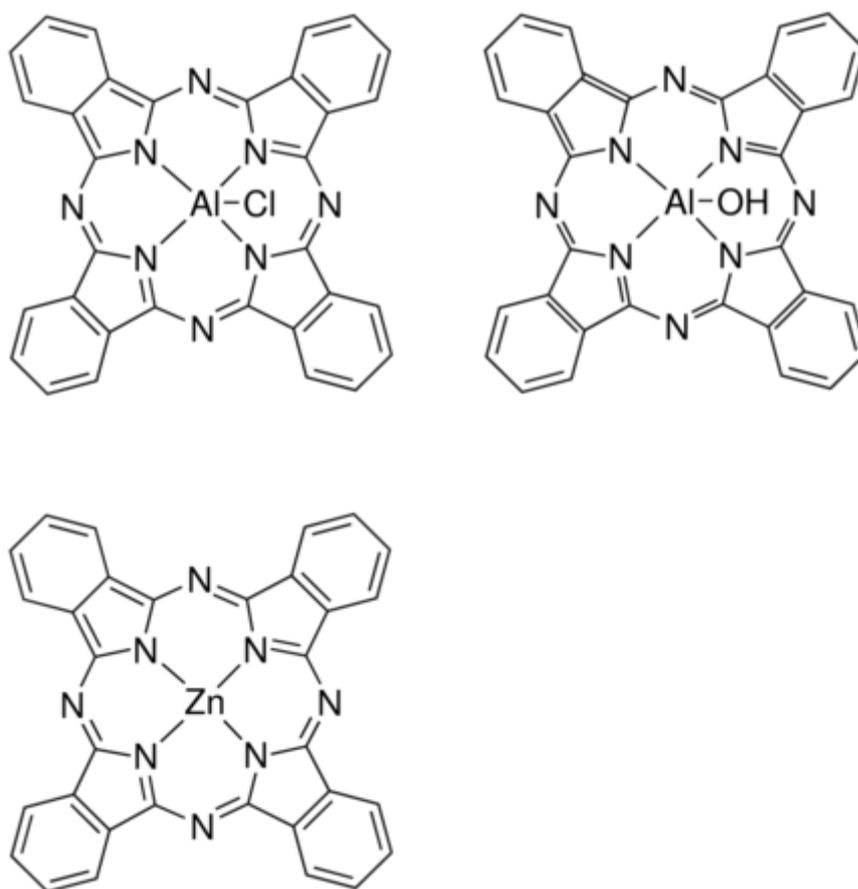


Figura 1: Estruturas das ftalocianinas de Alumínio-cloro (AlPcCl), Alumínio-hidróxido (AlPcOH) e zinco (ZnPc). Fonte: <https://www.sigmaaldrich.com/>

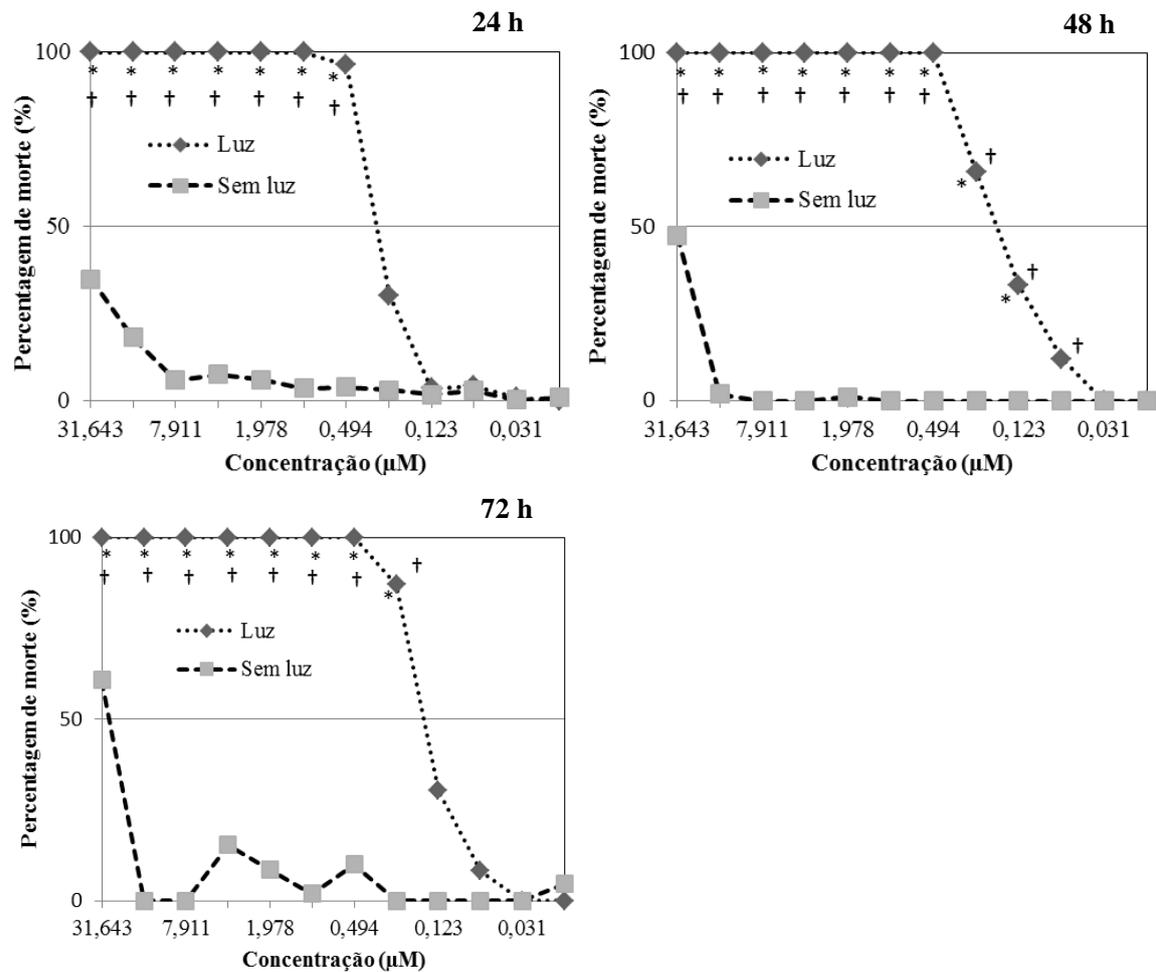


Figura 2: Efeito do tratamento de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* com a ftalocianina de alumínio cloro (AlPcCl), na presença LED vermelho fosco (potência de 2,5-2,3 μW) ou ausência de luz, após 24 , 48 e 72 horas . Ftalocianina testada nas concentrações de 31,643 a 0,015 μM contra formas promastigotas ($4 \times 10^6/\text{ml}$); percentagem de morte determinada pelo ensaio do XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida). Cada ponto representa a média das medidas de percentagem de morte em triplicata. (*) $p < 0,05$ em relação as amostra não iluminadas. (†) $p < 0,05$ em relação ao controle.

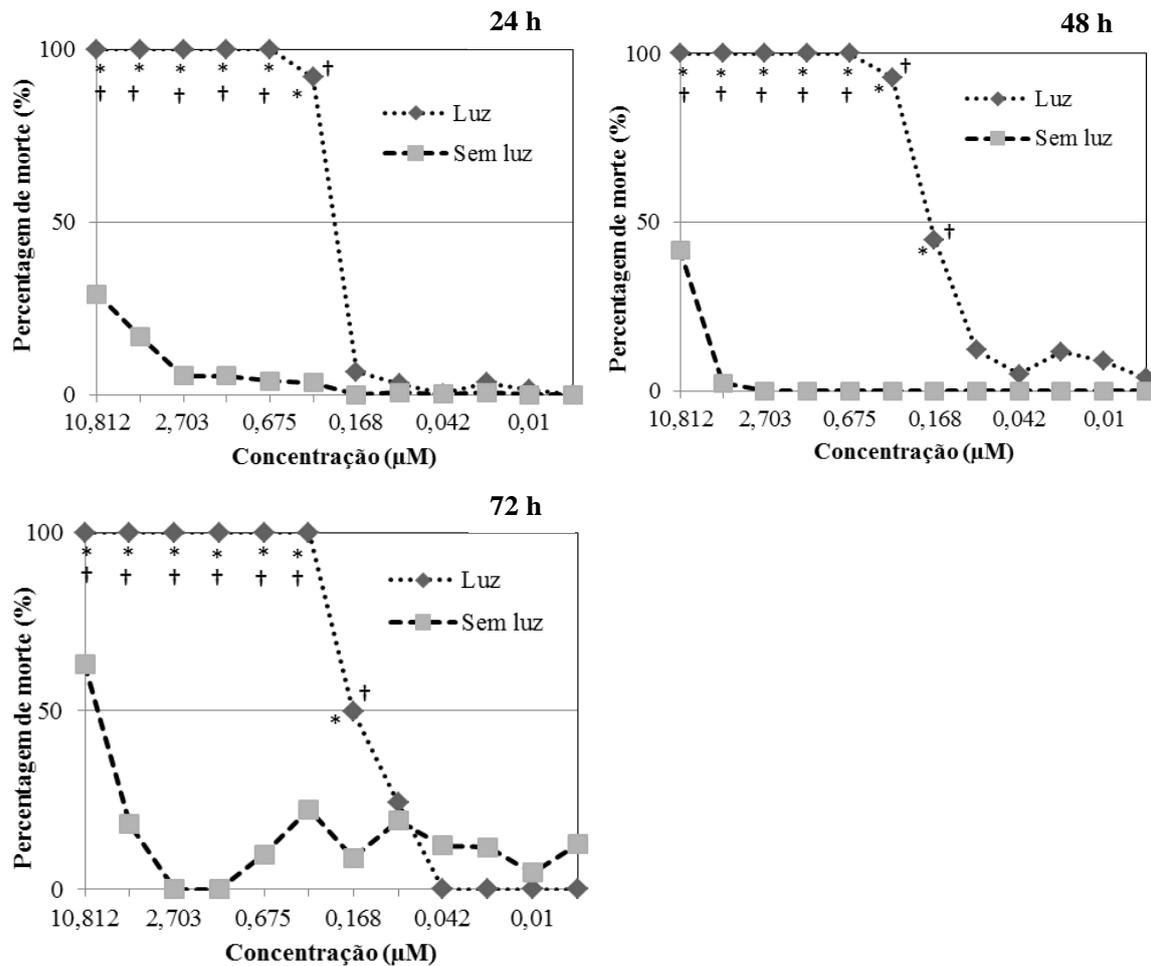


Figura 3: Efeito do tratamento de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* com a ftalocianina de alumínio hidróxido (AlPcOH), na presença LED vermelho fosco (potência de 2,5-2,3 μW) ou ausencia de luz, em 24 , 48 e 72 horas . Ftalocianina testada em concentrações de 10,812 a 0,005 μM contra formas promastigotas ($4 \times 10^6/\text{ml}$); percentagem de morte determinada pelo ensaio do XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfonil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida). Cada ponto representa a média das medidas de percentagem de morte em triplicata. (*) $p < 0,05$ em relação as amostra não iluminadas. (†) $p < 0,05$ em relação ao controle.

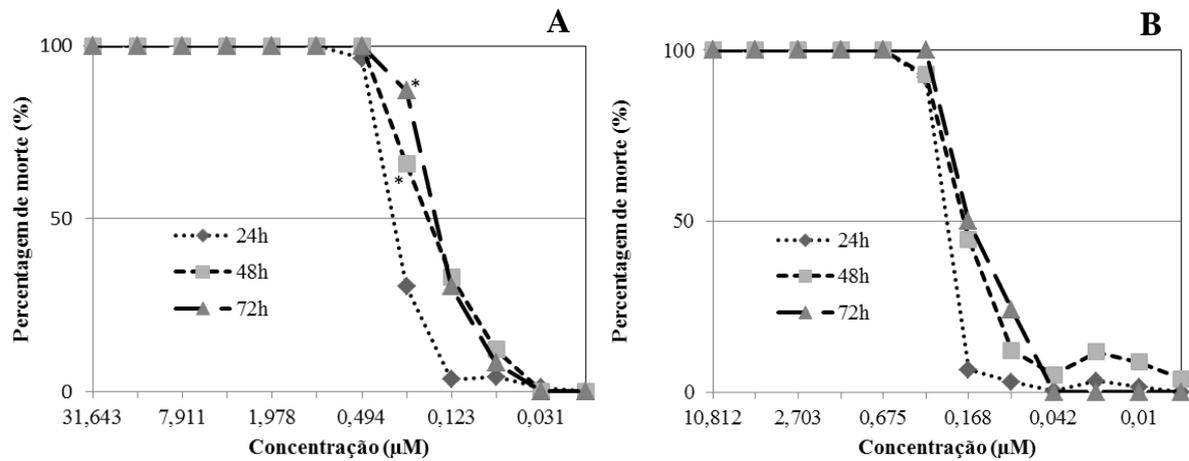


Figura 4: Efeito do tratamento de formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* com as AIPcCl (A) e AIPcOH (B) na presença LED vermelho fosco (potência de 2,5-2,3 µW) em 24, 48 e 72 horas. Ftalocianinas testadas em concentrações de 31,643 a 0,015 µM (AIPcCl) e 10,812 a 0,005 µM (AIPcOH) contra formas promastigotas (4×10^6 /ml) de *L. (L.) amazonensis*; percentagem de morte determinada pelo ensaio do XTT (2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida). Cada ponto representa a média das medidas de percentagem de morte em triplicata. (*) $p < 0,05$ em relação a mesma concentração no tempo de 24 horas.

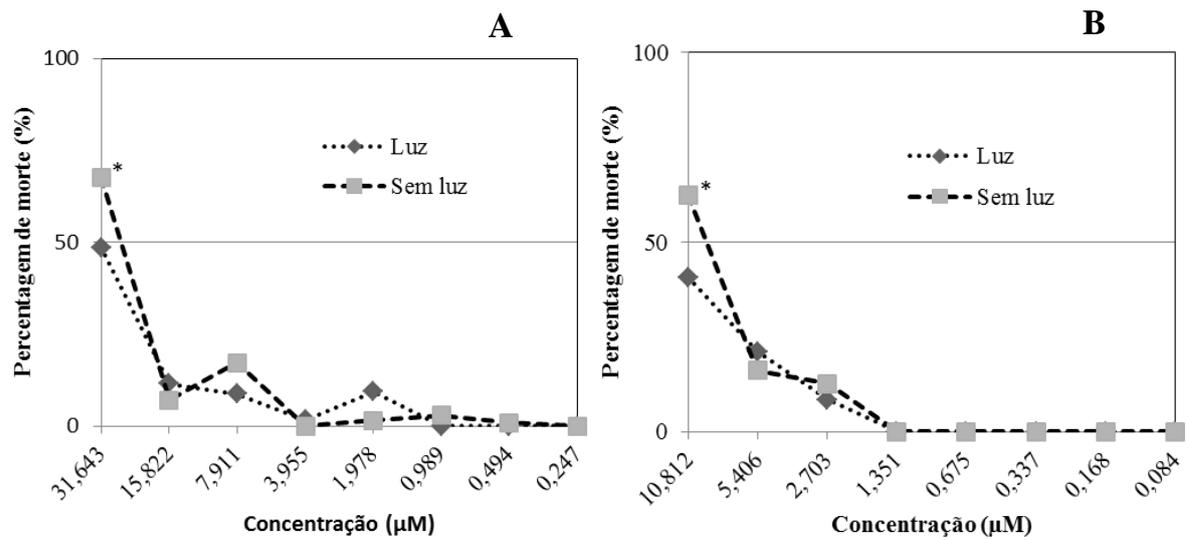


Figura 5: Fotossensibilidade de macrófagos J774.A1 com as AlPcCl (A) e AlPcOH (B) na presença LED vermelho fosco (potência de 2,5-2,3 μW) ou ausência de luz em 24 horas. Macrófagos J774.A1 ($5 \times 10^4/\text{ml}$) tratados com AlPcCl (31,643-0,247 μM) e AlPcOH (10,812-0,084 μM). Macrófagos não tratados foram utilizados como controles. Para cada concentração que causou citotoxicidade para 50% ou mais de macrófagos J774.A1 com as AlPcCl (31,643 μM) e AlPcOH (10,812 μM), foram avaliadas as diferenças entre o tratamento com a luz (30 minutos com luz LED) e sem luz. Cada ponto representa a média das medidas de percentagem de morte em triplicata. (*) $p < 0,05$ em relação as amostras na mesma concentração iluminadas.

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

- As ftalocianinas de alumínio cloro (AlPcCl) e alumínio hidróxido (AlPcOH) na presença de luz LED têm potente atividade sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*;
- As ftalocianinas ALPcCl e AlPcOH mostraram-se seletivas para os parasitos, e apresentaram baixa citotoxicidade para macrófagos J774.A1 e hemácias do tipo O;
- A ftalocianina de zinco (ZnPc) não apresentou atividade sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*;
- Os resultados apresentados neste estudo reforçam a possibilidade de utilização da terapia fotodinâmica no tratamento da leishmaniose tegumentar americana;
- A terapia fotodinâmica revelou-se como uma estratégia promissora para o tratamento da leishmaniose;

PERSPECTIVAS FUTURAS

- Avaliar a atividade leishmanicida das ftalocianinas incorporadas em sistemas nanoparticulados como nanoemulsões, ou lipossomos, o que poderá aumentar a solubilidade dos mesmos, assim como aumentar sua seletividade no tecido alvo;
- Testar a fotoatividade destes compostos em formas amastigotas, as quais são encontradas intracelularmente (tecdual);
- Verificar a atividade das ftalocianinas em modelos animais;
- Demonstrar através de ensaios de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, as alterações morfológicas causadas nos parasitos;