

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOPATOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

CAMILA GALVÃO DE ANDRADE

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA A
ZINCOPORFIRINAS SOBRE *Leishmania braziliensis*

Recife
2018

CAMILA GALVÃO DE ANDRADE

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA A
ZINCOPORFIRINAS SOBRE *Leishmania braziliensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr.
Co-orientadora: Profa. Dra. Adriana Fontes

**Recife
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Andrade, Camila Galvão de
Efeito da terapia fotodinâmica associada a zincoporfirinas sobre *Leishmania braziliensis* / Camila Galvão Andrade. – 2018.

57 f. : il.

Orientador: Luiz Bezerra de Carvalho Júnior.
Coorientadora: Adriana Fontes.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Recife, 2018.
Inclui referências e anexos.

1. Leishmaniose I. Carvalho Júnior, Luiz Bezerra de (orientador) II. Fontes, Adriana (coorientadora) III. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 163

CAMILA GALVÃO DE ANDRADE

**EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ASSOCIADA A
ZINCOPORFIRINAS SOBRE *Leishmania braziliensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde, do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biologia Aplicada à Saúde.

Aprovada em: 12 / 03 / 2018

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr.
(Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Adriana Fontes
(Co-orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dra. Martha Simões Ribeiro
(Examinadora Externa)
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares

Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças
(Examinador Externo)
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho
(Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Taciana Mirely Maciel Higino
(Examinadora Externa)
Fundação Altino Ventura

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Lucineide e Meliony, por todo apoio ao longo dessa trajetória, pelo exemplo de vida que são para mim e por sempre terem estimulado e dado todo suporte à minha educação.

Ao meu noivo, Wanderley, por todo incentivo, apoio e compreensão.

A minha irmã Marcela, pelo companheirismo e enorme disposição para revisar meus textos, treinar apresentações, etc.

A minha grande e amada família, avós, tios e primos, os quais desejo sempre poder orgulhar.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Bezerra de Carvalho Jr., por ter aberto as portas do universo científico para mim ainda na iniciação científica, por ser uma inspiração como pessoa e pela confiança em mim depositada.

A minha co-orientadora, Prof^a. Dra. Adriana Fontes, muito obrigada por todo o suporte nesses sete anos de convívio. Sua disponibilidade, entusiasmo e dedicação à pesquisa são admiráveis.

À Karla Ribeiro e Cássia Cunha, inicialmente colaboradoras e atualmente amigas que tive o prazer de conhecer durante o doutorado, muito obrigada por toda a ajuda. Vocês foram peças fundamentais para a realização desse trabalho!

À Larissa Matos, que iniciou essa jornada ao meu lado na iniciação científica, sou grata pelo ombro-amigo, pelo “teto” oferecido em São Paulo e por todo apoio de sempre.

Aos amigos e colegas de trabalho Prof. Dr. Paulo Euzébio e Carinna Lima, muito obrigada por todo auxílio ao longo desses anos.

Aos professores Martha Ribeiro, Júlio Rebouças, Regina Bressan e Maria Tereza Correia, pela colaboração, por terem me recebido em seus respectivos grupos de pesquisa e me fornecido meios para realização desse trabalho.

Aos colegas dos diversos grupos de pesquisa nos quais transitei: IMOBIO, Laboratório de Biofísica Química e Laboratório de Biologia Celular de Patógenos, sou grata pelo suporte científico e por todo o auxílio recebido.

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A terapia atual enfrenta desafios relacionados à presença de efeitos colaterais e desenvolvimento de resistência. A terapia fotodinâmica (TFD) está emergindo como uma potencial modalidade terapêutica para Leishmaniose Cutânea. Neste trabalho, foi avaliado o efeito fotodinâmico das Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinas ZnTE-2-PyP⁴⁺ e ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ sobre *Leishmania braziliensis*. Promastigotas foram incubadas com a ZnTE-2-PyP⁴⁺ (5 ou 10 µM) durante 10 min. As amostras foram irradiadas com LED (300 mW/cm²) por 5 ou 10 min. Um protocolo semelhante foi também utilizado para amastigotas. Os efeitos fototóxicos induzidos nas promastigotas foram analisados através da contagem celular em câmara de Neubauer, marcação com iodeto de propídio (IP) e rodamina 123 (Rh 123) por citometria de fluxo e microscopias eletrônicas de transmissão e varredura (MET e MEV). A citotoxicidade relacionada ao tratamento foi avaliada em células de mamíferos (células VERO, macrófagos J774 e células de exsudato peritoneal de camundongos BALB/c). Promastigotas foram também incubadas com a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ (5 ou 10 µM) durante 10 min, seguido de irradiação por 2 ou 5 min. O dano celular foi avaliado através da contagem celular, marcação com IP e Rh 123, além da microscopia de contraste de fase. Os resultados demonstraram que o tratamento fotodinâmico associado a zincoporfirinas foi capaz de induzir dano celular em mais de 90% das promastigotas, sendo um maior número de células afetadas quando o fotossensibilizador ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ foi utilizado. O tratamento com a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ + luz apresentou toxicidade superior a induzida pela ZnTE-2-PyP⁴⁺ + luz frente às células de mamífero. A marcação com IP sugere que ambas as zincoporfirinas + luz provocam a perda da integridade da membrana celular do parasita. Quanto ao potencial de membrana mitocondrial, observou-se hiperpolarização nas células tratadas com ZnTE-2-PyP⁴⁺ + luz e despolarização acentuada nas células tratadas com ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ + luz. As avaliações ultraestruturais de promastigotas após o tratamento fotodinâmico associado a ZnTE-2-PyP⁴⁺ indicaram danos como perda de material citoplasmático, surgimento de vacúolos, enrugamento da membrana plasmática e redução do volume celular. O número de amastigotas no interior dos macrófagos foi reduzido em cerca de 40% após a aplicação da ZnTE-2-PyP⁴⁺ + luz. Os resultados obtidos permitem apontar a TFD associada a zincoporfirinas como uma alternativa promissora para terapia da Leishmaniose Cutânea.

Palavras-chave: *Leishmania braziliensis*. Terapia fotodinâmica. Zincoporfirina.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Current therapy faces challenges related to the presence of side effects and development of resistance. Photodynamic therapy (PDT) is emerging as a therapeutic modality for Cutaneous Leishmaniasis. In this work, we evaluated the photodynamic effect of the Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alkylpyridinium-2-yl)porphyrins ZnTE-2-PyP⁴⁺ and ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ zinc porphyrins on *Leishmania braziliensis*. Promastigotes were incubated with ZnTE-2-PyP⁴⁺ (5 or 10 μ M) for 10 min. The samples were irradiated with LED (300 mW/cm²) for 5 or 10 min. A similar protocol was also used for amastigote forms. The phototoxic effects induced in promastigotes were evaluated by cell counting in Neubauer chamber, flow cytometry labeling with propidium iodide (PI) and rhodamine 123 (Rh 123) and transmission (TEM) and scanning electron microscopy (SEM). The cytotoxic related to the treatment was evaluated in mammalian cells (VERO cells, J774 macrophages and peritoneal exudate cells from BALB/c mice). Promastigotes were also incubated with ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ (5 μ M or 10 μ M) for 10 min, followed by irradiation for 2 or 5 min. Cell damage was assessed by cell counting, IP and Rh 123 labeling, and phase contrast microscopy. The results demonstrated that PDT associated with zinc porphyrins was able to induce cellular damage in more than 90% of the promastigotes, and the highest percentage of cells were affected when ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ was used as the photosensitizer. Treatment with ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ + light showed greater toxicity to mammalian cells than that induced by ZnTE-2-PyP⁴⁺ + light. Labeling with IP suggests that both zinc porphyrins + light caused loss of cell membrane integrity. Regarding to mitochondrial membrane potential, a hyperpolarization was observed in cells treated with ZnTE-2-PyP⁴⁺ + light and an accentuated depolarization in cells treated with ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ + light. The ultrastructural evaluation of promastigotes after PDT associated with ZnTE-2-PyP⁴⁺ indicated damage such as loss of cytoplasmic material, presence of vacuoles, plasma membrane wrinkling, and cell volume reduction. The amount of amastigotes within the macrophages was reduced by about 40% after application of PDT associated with ZnTE-2-PyP⁴⁺ + light. The results obtained allow us to point out PDT associated with zinc porphyrins as a promising alternative for cutaneous Leishmaniasis therapy.

Keywords: *Leishmania braziliensis*. Photodynamic therapy. Zinc porphyrin.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	- Ácido aminolevulínico
$\Delta\Psi_M$	- Potencial de membrana mitocondrial
d.C.	- depois de Cristo
DMSO	- Dimetilsulfóxido
FIOCRUZ	- Fundação Oswaldo Cruz
IP	- Iodeto de propídio
IV	- Índice de variação
LED	- <i>Light emitting diode</i> – diodos emissores de luz
LTA	- Leishmaniose Tegumentar Americana
MC	- Mediana de fluorescência dos parasitas do grupo controle
MT	- Mediana da fluorescência dos parasitas tratados
MTT	- 3-(4,5- dimetiliazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
OMS	- Organização Mundial de Saúde
S ₀	- Estado singleto fundamental
S ₁	- Estado singleto excitado
PBS	- Tampão fosfato-salino
PpIX	- Protoporfirina
Rh 123	- Rodamina 123
ROS	- <i>Reactive oxygen species</i> – espécies reativas de oxigênio
SFB	- Soro fetal bovino
T ₁	- Estado tripleto excitado
TFD	- Terapia fotodinâmica
ZnP	- Zinco porfirina
ZnTE-2-PyP ⁴⁺	- Zn(II) <i>meso</i> -tetrakis(<i>N</i> -etilpiridínio-2-il)porfirina
ZnTnHex-2-PyP ⁴⁺	- Zn(II) <i>meso</i> -tetrakis(<i>N</i> -hexilpiridínio-2-il)porfirina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1 LEISHMANIOSE.....	13
2.1.1 Epidemiologia.....	15
2.1.2 Agente etiológico e ciclo evolutivo.....	16
2.1.3 Terapêutica atual.....	19
2.2 TERAPIA FOTODINÂMICA.....	20
2.2.1 Aspectos gerais.....	20
2.2.2 Fotossensibilizadores.....	21
2.2.2.1 Porfirinas.....	22
2.2.3 Terapia fotodinâmica no tratamento da Leishmaniose.....	29
3 OBJETIVOS.....	32
3.1 GERAL.....	32
3.2 ESPECÍFICOS.....	32
4 ARTIGO PUBLICADO NO PERIÓDICO <i>PHOTOCHEMICAL & PHOTOBIOLOGICAL SCIENCES</i>.....	33
5 EFEITO FOTODINÂMICO DA Zn(II) MESO-TETRAKIS(N-N-HEXILPIRIDINIO-2-IL)PORFIRINA SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>Leishmania braziliensis</i>.....	34
5.1 BREVE INTRODUÇÃO.....	34
5.2 METODOLOGIA.....	34
5.2.1 Parasitas.....	34
5.2.2 Ensaio fotodinâmico.....	34
5.2.3 Marcação com iodeto de propídio.....	35
5.2.4 Detecção de alteração do potencial de membrana mitocondrial.....	36
5.2.5 Ensaio de Citotoxicidade.....	36
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.3.1 Efeito da terapia fotodinâmica em formas promastigotas.....	37
5.3.2 Alteração da integridade da membrana celular.....	41
5.3.3 Análise da alteração do potencial de membrana mitocondrial.....	42

5.3.4 Efeito citotóxico.....	44
5.4 CONCLUSÕES.....	46
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
7 PERSPECTIVAS.....	49
REFERÊNCIAS.....	50
ANEXO – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	57

1 INTRODUÇÃO

Leishmaniose é o termo utilizado para descrever um grupo de doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania*. Esses protozoários são transmitidos para mamíferos através da picada de fêmeas infectadas de mosquitos do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo) e podem causar desfiguração e morte quando a doença não é tratada corretamente (BRISTOW et al., 2006). O ciclo de vida do parasita envolve duas formas distintas: a promastigota, que é encontrada no vetor; e a amastigota, forma intracelular encontrada em células de mamíferos (FERNÁNDEZ; MALCHIODI; ALGRANATI, 2011).

As manifestações clínicas da Leishmaniose incluem desde lesões cutâneas indolores até desfiguração facial, e, em casos mais severos, envolvimento do sistema reticuloendotelial. Quanto à apresentação clínica, existem três classificações principais normalmente aceitas: Leishmaniose Cutânea, Leishmaniose Mucocutânea e Leishmaniose Visceral ou Calazar (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

A Leishmaniose Cutânea é uma manifestação dérmica que representa até 75% de todos os casos novos anuais geralmente causados por *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Essa forma clínica é caracterizada pela presença de uma ou mais pequenas pápulas vermelhas que se tornam mais escuras e se transformam em úlceras com bordas elevadas após algumas semanas. Embora não seja letal, o curso da doença é muitas vezes acompanhado por repercussão psicológica e social, estigmatização e desfiguração (IQBAL et al., 2016). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), 90% dos casos registrados da forma cutânea da Leishmaniose ocorrem em seis países: Irã, Arábia Saudita, Síria, Afeganistão, Peru e Brasil (SILVA et al., 2015).

Ao longo dos anos, diversos fármacos têm sido utilizados no tratamento da Leishmaniose. Antimoniais pentavalentes, pentamidinas e anfotericina B estão entre os fármacos atualmente utilizados na terapia dessa doença. No entanto, o uso desses medicamentos apresenta algumas limitações, tais como níveis elevados de toxicidade em seres humanos ou o desenvolvimento de mecanismos de resistência nos parasitas (BASTOS et al., 2012; MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007).

A terapia fotodinâmica (TFD) surge então como uma opção promissora para o tratamento antiparasitário, uma vez que pode oferecer uma destruição rápida e localizada das lesões, sem afetar o tecido normal adjacente (GHAFARIFAR et al., 2006). A técnica é baseada na utilização de substâncias com propriedades fotossensibilizadoras e ativação destas pela luz, na presença de oxigênio. Após a irradiação, a ativação da molécula do fotossensibilizador resulta na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS - *reactive oxygen species*), que são tóxicas

para a célula e levam a sua morte por estresse oxidativo. As principais aplicações da TFD estão na oncologia, sendo as mais comuns aquelas contra ceratose actínica, carcinoma basocelular e doença de Bowen. Porém, existem outras indicações terapêuticas não-oncológicas, como o tratamento de psoríase, acne, degeneração macular e infecções microbianas. Nos últimos anos, estudos têm demonstrado resultados promissores da aplicação da TFD no tratamento da Leishmaniose Cutânea. Contudo, os dados disponíveis na literatura ainda são limitados, impedindo a implementação dessa modalidade de tratamento na prática clínica de rotina. Dessa forma, a busca por protocolos sistematizados de aplicação da TFD na Leishmaniose Cutânea, além da compreensão do mecanismo de ação desta terapia, também precisam ser melhor investigados para que a mesma seja mais efetiva (BASTOS et al., 2012; GARDNER et al., 2010; PELOI et al., 2011).

O sucesso da TFD depende, entre outros fatores, da escolha adequada do fotossensibilizador (MOREIRA et al., 2012). No início da aplicação da TFD, apenas um número limitado de substâncias estava disponível para utilização como fotossensibilizador. Contudo, durante as duas últimas décadas foram descobertas ou sintetizadas novas substâncias sendo as mesmas introduzidas para o uso na TFD (BERLANDA et al., 2010).

Porfirinas, clorinas e ftalocianinas estão entre os fotossensibilizadores mais estudados para o uso na TFD, devido a sua eficiência na formação de ROS. As porfirinas pertencem a um grupo de compostos tetrapirrólicos que podem possuir propriedades químicas e físicas vantajosas para a TFD, como uma alta afinidade por membranas celulares (em particular, as catiônicas), versatilidade sintética e eficiência para gerar ROS (KOU; DOU; YANG, 2017; PAVANI; IAMAMOTO; BAPTISTA, 2012). Essas propriedades permitem, por exemplo, a aplicação das porfirinas na TFD, na detecção de tecidos neoplásicos e na inibição de agentes virais no sangue (CALVETE; GOMES; MOURA, 2009). Estudos demonstraram que as porfirinas de zinco se ligam mais fortemente às membranas e seriam fotossensibilizadores mais eficientes do que os seus análogos desmetalados. Uma outra vantagem desses compostos é a sua carga positiva, o que facilita sua interação com superfícies negativamente carregadas da célula, o que pode contribuir para a eficiência da TFD (BENOV; CRAIK; BATINIC-HABERLE, 2011).

Devido às limitações apresentadas pela terapia atualmente empregada para Leishmaniose, a busca por novos medicamentos e formas de tratamento mostra-se cada vez mais necessária. Assim, este trabalho teve como enfoque principal a avaliação do efeito fotodinâmico mediado por Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinas sobre formas promastigotas e

amastigotas de *L. braziliensis*, um dos principais agentes etiológicos da Leishmaniose Cutânea.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEISHMANIOSE

A Leishmaniose é uma doença infecciosa, com ampla distribuição mundial, causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Diversas espécies podem ser responsáveis pela infecção em humanos, que pode se apresentar em três formas clínicas principais. São elas: Leishmaniose Cutânea (produz lesões cutâneas, que podem ser ulcerosas ou não, porém, são limitadas e indolores), Leishmaniose Mucocutânea ou Cutâneo-Mucosa (presença de complicações que levam ao aparecimento de lesões ulcerosas destrutivas na mucosa do nariz, boca e faringe) e Leishmaniose Visceral ou Calazar (parasitas apresentam tropismo acentuado pelo sistema fagocitário mononuclear do baço, medula óssea e tecidos linfoides) (NEVES; MELO; VITOR, 2005).

A forma cutânea é a mais comum da Leishmaniose, podendo ser causada por mais de 20 espécies. Aproximadamente metade das pessoas infectadas apresenta lesões em áreas visíveis como cabeça, mãos e braços, pois esses locais normalmente são mais expostos à picadas do mosquito (SNOEK et al., 2008). É possível ainda ocorrer a disseminação dessa forma clínica, levando ao desenvolvimento da Leishmaniose Cutâneo-Difusa, na qual são observadas lesões múltiplas e crônicas, semelhantes às da Hanseníase. O número de lesões pode alcançar centenas. Por produzir lesões mais agressivas, capazes de desfigurar partes do corpo, em especial a face, a Leishmaniose Mucocutânea é uma das formas mais temidas. Frequentemente, a mesma é causada pela espécie *L. braziliensis*, porém, há relatos de infecções causadas por outras espécies. Por outro lado, a Leishmaniose Visceral, também conhecida como “kala-azar” ou “febre-negra”, é a forma mais severa da Leishmaniose, devido à migração do parasita para os órgãos viscerais (BASTOS et al., 2012).

As Leishmanioses Cutânea e Mucocutânea ocorridas no continente americano (Novo Mundo) são geralmente denominadas coletivamente como Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Há registros da doença na América desde os tempos mais antigos, tendo sido encontrados vasos de cerâmica produzidos por índios no Peru, que retratam as mutilações de lábios e narizes características da Leishmaniose Mucocutânea, datados de 400 a 900 anos d.C.. No Brasil, a primeira referência de LTA foi relatada em 1827. Em 1909, Lindenberg observou formas do parasita em trabalhadores que atuavam na construção de rodovias em São Paulo. Desde então, a transmissão da doença vem sendo descrita em vários municípios de todos os estados brasileiros (BASANO; CAMARGO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A infecção se inicia com uma picada de inseto e no local se forma uma lesão de aparência simples, que se amplia lentamente podendo atingir um tamanho de 3-5 cm em alguns meses, com lesões que vão desde pequenas pápulas eritematosas a lesões granulomatosas escuras maiores, muitas vezes com centros ulcerados e bordas endurecidas (Figura 1). A úlcera típica de Leishmaniose Cutânea é indolor e costuma ter formato arredondado ou ovalado. Suas bordas são bem delimitadas e elevadas com fundo avermelhado e granulações grosseiras. O período de incubação é de, em média, 2 a 3 meses, mas pode variar entre 2 semanas a 2 anos. A severidade das manifestações clínicas dependem da espécie do parasita, local da picada, quantidade de picadas e do estado imunológico e nutricional, além da idade do hospedeiro (ENK et al., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009, 2010a).

Figura 1 – Lesões típicas da Leishmaniose Cutânea: pápula (A), nódulo (B) e úlcera (C).



Fonte: Adaptado de OLLIARO et al., 2013.

O diagnóstico é baseado na avaliação de aspectos clínicos, histórico do paciente (passagem por áreas endêmicas) e análise histológica/citológica das lesões (biópsia) (GARDLO et al., 2003). A confirmação do diagnóstico do processo infeccioso ocorre quando são observados parasitas em tecidos ou fluidos biológicos do hospedeiro. O emprego de métodos laboratoriais auxilia tanto na confirmação dos achados clínicos como no fornecimento de informações epidemiológicas, uma vez que a identificação da espécie envolvida é importante para o manejo do tratamento e implementação de medidas de controle. Em Pernambuco, principalmente nas zonas rurais, o diagnóstico é feito a partir da análise de critérios clínicos e epidemiológicos, porém, em Recife, estão disponíveis técnicas tradicionais (citologia) e de biologia molecular (PCR) nos grandes hospitais e centros de pesquisa (BRITO et al., 2012).

2.1.1 Epidemiologia

A OMS considera a Leishmaniose uma das seis principais doenças infecciosas e um dos mais comuns problemas de saúde pública nas Américas, devido a sua alta incidência, ampla distribuição geográfica e capacidade de produzir deformidades. A Leishmaniose afeta 12 milhões de pessoas ao redor do mundo, e a estimativa é de que existam 310 milhões de pessoas com risco de adquirir a infecção, sendo 2 milhões de casos novos diagnosticados a cada ano. A incidência anual é estimada em 1 – 1,5 milhões de casos de Leishmaniose Cutânea e 500.000 casos de Leishmaniose Visceral. Destes 2 milhões de casos novos, apenas 600 mil são oficialmente declarados, uma vez que a notificação não é obrigatória em todos os países onde a doença é encontrada, o que demonstra o descaso das autoridades públicas em relação a essa enfermidade. A Leishmaniose é a segunda maior causa de morte relacionada a um parasita, ficando atrás apenas da Malária, causando 20.000 a 30.000 óbitos anualmente (NEVES; MELO; VITOR, 2005; WHO, 2016).

A doença está presente em quatro continentes (Ásia, Europa, África e Américas), sendo considerada endêmica em 88 países. A maioria desses países é considerada em desenvolvimento ou subdesenvolvido (WHO, 2016). No Brasil, a Leishmaniose Tegumentar apresenta distribuição em todo o território nacional, sendo observados registros da enfermidade em todos os estados. O número de casos tem aumentado gradualmente nos últimos 20 anos, e, entre 1990 e 2010, o país apresentou uma média de mais de trinta mil casos anuais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010b).

Em Pernambuco, o primeiro registro de LTA foi feito por volta de 1930, quando a doença foi detectada em trabalhadores rurais. Entre 1989 e 1991, 1.604 casos foram reportados ao Ministério da Saúde, sendo a maioria de homens adultos. De 2001 a 2010, o número de registros em Pernambuco subiu para 4.855, com uma média de 485 casos por ano. Apesar da maior prevalência da doença se dar na Zona da Mata (mais de 60% dos casos), observa-se uma ampliação da distribuição para outras áreas em todo o estado, como regiões do Agreste, por exemplo. Destaca-se ainda que, a maioria das pessoas afetadas vive em áreas rurais e carece de boas condições de saúde pública, estando expostos aos fatores de risco da doença (BRITO et al., 2012; REIS et al., 2008).

Diversos são os fatores que contribuem para a disseminação da doença ao redor do mundo. Entre eles, podemos citar: resistência ao tratamento, controle inadequado de vetores e reservatórios animais, falta de vacinas eficientes, processo de urbanização e desmatamento,

migrações da zona rural para áreas urbanas, além da deficiência de condições socioeconômicas (IQBAL et al., 2016).

2.1.2 Agente etiológico e ciclo evolutivo

A Leishmaniose é causada por protozoários da família *Trypanosomatidae* e do gênero *Leishmania*, sendo transmitida por insetos vetores da família *Psychodidae*, hematófagos do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomya* (Figura 2), cuja distribuição é vasta em climas quentes e temperados, e em áreas rurais e urbanas (RATH et al., 2003).

Figura 2 - *Lutzomya longipalpis*, um dos vetores da Leishmaniose.

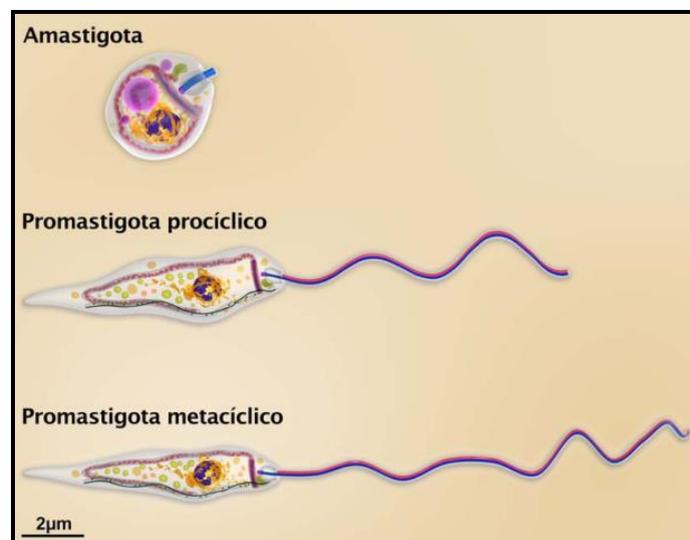


Fonte: www.vectorbase.org

O parasita, por sua vez, foi descrito pela primeira vez em 1903, simultaneamente, por Charles Donovan e William Leishman, do qual deriva sua nomenclatura. Na América, são reconhecidas oito espécies de *Leishmania* que podem causar a doença no homem, essas podem pertencer ao subgênero *Vianna* (*V*) ou *Leishmania* (*L*). Assim, os agentes etiológicos da Leishmaniose nas Américas são: *Leishmania* (*V*) *braziliensis*, *Leishmania* (*V*) *guyanensis*, *Leishmania* (*V*) *panamensis*, *Leishmania* (*V*) *lainsoni*, *Leishmania* (*L*) *mexicana*, *Leishmania* (*L*) *amazonensis*, *Leishmania* (*L*) *venezuelensis* e *Leishmania* (*L*) *chagasi*. Cada espécie apresenta características peculiares em relação às manifestações clínicas, vetores, reservatórios, padrões epidemiológicos, distribuição geográfica e inclusive à resposta terapêutica. No Brasil, há atualmente sete espécies de *Leishmania* responsáveis pela doença em humanos. A *Leishmania* (*V*) *braziliensis* foi a primeira espécie a ser descrita e relacionada como agente etiológico da LTA. É uma das espécies mais importantes, devido a sua ampla distribuição no país. Essa espécie pode ainda ser encontrada desde a América Central até o norte da Argentina. A *Leishmania* (*V*) *braziliensis* é o principal agente etiológico no estado de Pernambuco (BASANO; CAMARGO, 2004; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; BRITO et al., 2012).

Os protozoários causadores da Leishmaniose (Figura 3) caracterizam-se por apresentarem duas formas durante o seu ciclo de vida: a forma amastigota, na qual o parasita se encontra no interior das células dos hospedeiros vertebrados, e a forma promastigota, na qual os parasitas se desenvolvem no tubo digestivo do hospedeiro invertebrado. Enquanto a forma promastigota é flagelada e extracelular, a forma amastigota é intracelular e com pouco movimento. A forma amastigota é pequena (2 – 6 μm), tem o corpo celular levemente achatado e seu contorno é ovoide, por vezes elíptico ou fusiforme. Já a forma promastigota tem dimensões de 14 – 20 μm de comprimento, tem núcleo central e cinetoplasto situado próximo à extremidade anterior (REY, 2010).

Figura 3 - Formas amastigota, promastigota procíclico e promastigota metacíclico.



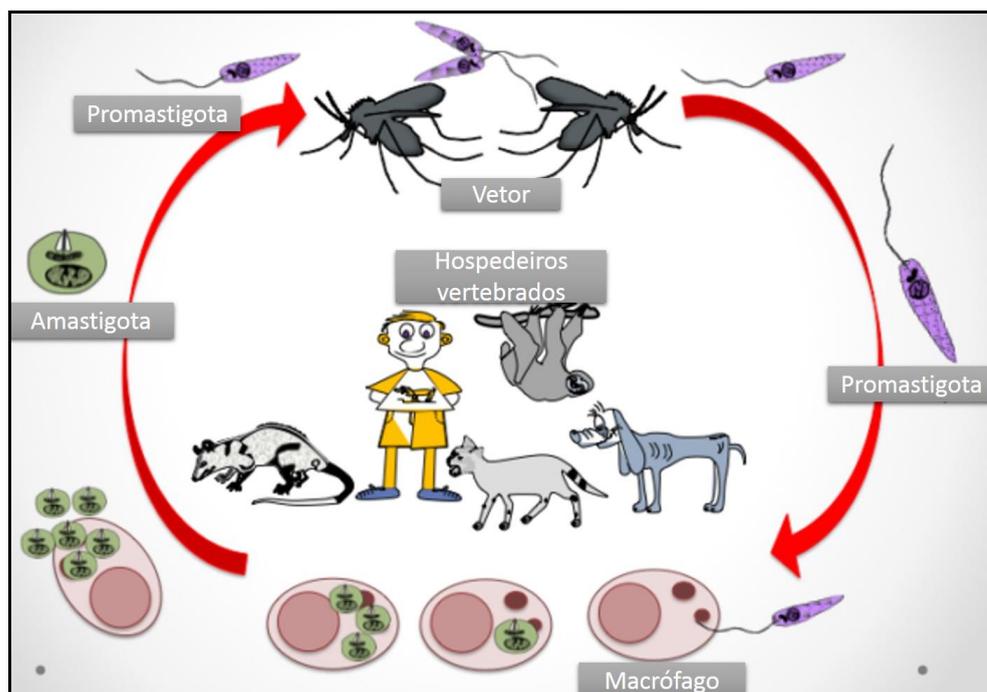
Fonte: TEIXEIRA et al., 2013.

O agente etiológico da Leishmaniose é um protozoário digenético, ou seja, cujo ciclo de vida é realizado em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. Os hospedeiros vertebrados incluem uma variedade de mamíferos, como a preguiça, roedores, tamanduá, raposas, cães e primatas, incluindo o homem. No Brasil, um dos principais reservatórios animais é o cão. Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomya*. A fêmea do mosquito é mais ativa no período do crepúsculo ao amanhecer e sua picada é indolor (NEVES; MELO; VITOR, 2005).

A Figura 4 ilustra o ciclo de vida do parasita. Os flebótomos infectam-se durante o repasto sanguíneo, ao picar animais portadores da doença. Durante a picada, o mosquito aspira, com o sangue ou linfa, macrófagos parasitados ou amastigotas livres e pode assim transmitir a doença ao homem e demais mamíferos. No hospedeiro invertebrado, ocorre o desenvolvimento do parasita no tubo intestinal. As formas amastigotas tornam-se alongadas e

seus flagelos crescem, passando o parasita para a forma promastigota procíclica. No intestino do vetor, as formas promastigotas procíclicas passam por um processo denominado metaciclologênese, no qual estas formas deixam de se reproduzir e tornam-se infectantes (promastigotas metacíclicas). As promastigotas procíclicas (formas reprodutivas, não infectantes) normalmente estão presas à parede do tubo digestivo do inseto. Durante o processo de metaciclologênese, o parasita sofre modificações bioquímicas em sua superfície, perdendo então sua capacidade de adesão ao epitélio do intestino médio do mosquito. Assim, as promastigotas metacíclicas destacam-se e migram para a cavidade bucal do inseto. As mesmas são então introduzidas nos mamíferos através da picada do mosquito. No mamífero, há a transformação do parasita para a forma amastigota, uma vez que esse se encontra no interior do macrófago. Para que se concretize a invasão do macrófago pelo parasita, esse último apresenta em seu exterior fosfatidilserina, simulando condições de apoptose e induzindo a fagocitose pelo macrófago (BAPTISTA; WAINWRIGHT, 2011; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015). Os macrófagos fagocitam rapidamente os parasitas, porém, não conseguem destruí-los, e assim ocorre a multiplicação de amastigotas em seu interior. O grande número de formas amastigotas pode levar ao rompimento do macrófago, fazendo com que essas formas atinjam a corrente sanguínea, podendo infectar outras células (RATH et al., 2003).

Figura 4 - Ciclo de vida de parasitas do gênero *Leishmania*.



Fonte: Adaptado de CARREIRA; MAGALHÃES; SILVA, 2014.

2.1.3 Terapêutica atual

O termo “Doenças Negligenciadas” é utilizado para designar um grupo de doenças que afeta principalmente países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, sendo muitas vezes endêmicas nestes países. São elas: Dengue, Leishmaniose, Malária, Tuberculose, Filariose, Esquistossomose, Doença de Chagas e Hanseníase. Essas doenças são ditas negligenciadas pois, enquanto medicamentos são desenvolvidos para demais doenças, as negligenciadas são muitas vezes marginalizadas por programas de pesquisa, indústria farmacêutica e sofrem com a carência de políticas públicas (DNDI, 2017).

Em particular, o tratamento da Leishmaniose Cutânea representa um grande desafio terapêutico devido à diversidade de espécies de *Leishmania* e ao amplo espectro de manifestações clínicas. Diversos esquemas terapêuticos (combinações de terapias) têm sido aplicados na busca por uma boa eficácia e mínimo de toxicidade. Porém, o tratamento ideal para Leishmaniose Cutânea ainda não foi identificado (IQBAL et al., 2016).

A terapêutica atual da doença visa à erradicação de amastigotas e a redução do tamanho das lesões para promover a cura com cicatrização mínima. Há alguns fármacos disponíveis no mercado, entretanto, seu uso é limitado devido à alta toxicidade e ao desenvolvimento de resistência. O tratamento da Leishmaniose é baseado principalmente na administração de antimoniais pentavalentes, pentamidinas e anfotericina B. A dose e o tempo de tratamento dependem da forma clínica e em alguns casos, só há evolução para cura após a tentativa de vários esquemas terapêuticos (PELLISSARI et al., 2011). O íon antimônio pentavalente, o antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) e o estiboglucanato de sódio (Pentostam[®]) foram introduzidos em 1945 e continuam a ser efetivos para algumas formas de Leishmaniose, porém, são requeridas altas doses, tempo prolongado de tratamento e apresentam elevada toxicidade. Devido à ocorrência de efeitos colaterais como artralgia, mialgia, náusea, vômito, entre outros, os pacientes tendem a interromper o tratamento e assim a doença pode evoluir com sérias complicações como o desenvolvimento de resistência aos medicamentos. Além disso, medicamentos como os antimoniais pentavalentes não podem ser administrados para mulheres grávidas, pacientes com insuficiência renal e hepática, arritmia cardíaca e doença de Chagas (CAMARGO; LANGONI, 2006; FRÉZARD et al., 2008).

Devido aos problemas com a terapia atual para Leishmaniose, a busca por novos medicamentos e regimes de tratamento mostra-se cada vez mais necessária. Alguns estudos têm investigado o uso de terapias alternativas para o tratamento da Leishmaniose (SIQUEIRA

et al., 2017). Estudos recentes têm sugerido a aplicação da terapia fotodinâmica como um tratamento promissor para Leishmaniose (PINTO et al., 2017; SOUZA et al., 2017).

2.2 TERAPIA FOTODINÂMICA

Relatos de mais de 4.000 anos descrevem o uso de extratos de plantas aliados a luz solar para o tratamento de vitiligo, porém, a primeira observação de sensibilização química do tecido devido à ação da luz só foi descrita em 1900, pelo cientista alemão Oscar Rabb. Esse último observou que a combinação da luz com o corante acridina era letal para o microrganismo *Paramecium caudatum* (ETHIRAJAN et al., 2011). Em 1903, Herman von Tappeiner, orientador de Rabb, denominou essa observação como “efeito fotodinâmico”. Desde então, a terapia fotodinâmica vêm atraindo grande atenção, principalmente devido a sua aplicação como ferramenta promissora no tratamento de tumores. Tem sido descrita também a aplicação dessa técnica na microbiologia, com o desenvolvimento da terapia fotodinâmica antimicrobiana (HAMBLIN, 2016).

2.2.1 Aspectos gerais

Desde a década de 70, a TFD vem se desenvolvendo e sendo utilizada de forma promissora na dermatologia, na odontologia, na oftalmologia, na oncologia e mais recentemente, na erradicação da *Leishmania*, promovendo bons resultados estéticos (WAINWRIGHT, 2017). A TFD envolve a aplicação de uma substância fotossensibilizadora, seguido de irradiação na presença de oxigênio, para causar dano ao tecido alvo (MONTROYA et al., 2015).

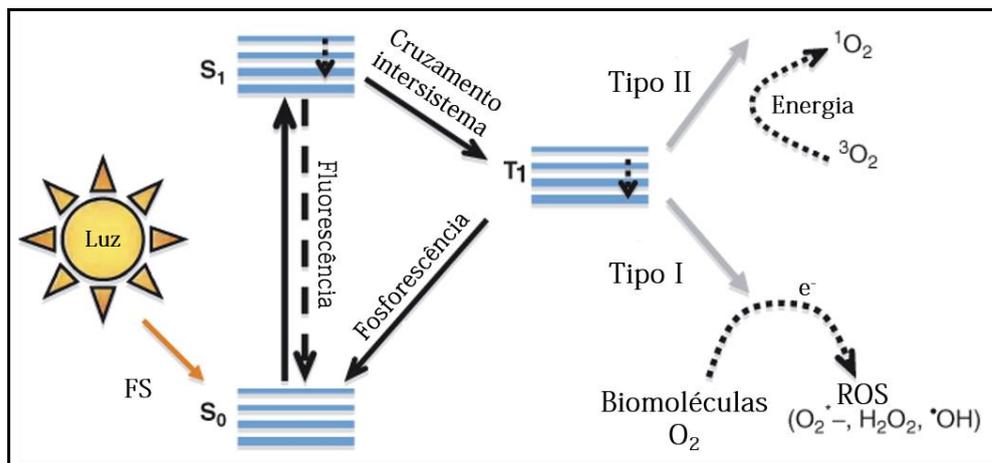
A exposição do fotossensibilizador à luz (em um comprimento de onda específico para cada fotossensibilizador) leva à ativação dessa substância através da absorção de energia. A ativação do fotossensibilizador causa a destruição do tecido alvo devido à geração de ROS que, por sua vez, interagem com os componentes da célula (lipídios, proteínas, etc) interferindo nas funções celulares e levando à morte celular (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009).

A quantidade de energia necessária para promover o elétron do estado fundamental para o estado excitado depende da estrutura molecular do fotossensibilizador. Sendo assim, a fonte de luz deve apresentar um comprimento de onda específico, que esteja contido no espectro de absorção do fotossensibilizador utilizado. Dessa forma, o comprimento de onda empregado durante a aplicação do fotossensibilizador é importante para promover essa transição

eletrônica. Devido à grande diversidade de estruturas moleculares de fotossensibilizadores disponíveis, os comprimentos de onda de ativação podem variar desde o final do ultravioleta ao início do infravermelho (BAPTISTA; WAINWRIGHT, 2011).

A Figura 5 esquematiza os mecanismos propostos para a terapia fotodinâmica. Inicialmente o fotossensibilizador se encontra no estado singlete fundamental (S_0). Após a absorção de luz (fótons), elétrons em S_0 são impulsionados para um estado de maior energia, o estado singlete excitado (S_1). Os elétrons podem retornar a S_0 e perder a sua energia em forma da fluorescência. Do estado S_1 , os elétrons podem também sofrer o processo conhecido como cruzamento intersistema, passando para o estado tripleto excitado (T_1). Por sua vez, ao retornarem do T_1 para S_0 pode ocorrer a fosforescência. Pode ocorrer ainda dois tipos de reações que levam à produção das espécies reativas de oxigênio: a tipo I e a tipo II. O mecanismo tipo I envolve a interação direta do fotossensibilizador com o alvo, por exemplo, com biomoléculas, havendo transferência de elétrons e formação de radicais reativos (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). Esses radicais são capazes de interagir com o oxigênio, formando produtos de oxidação, tais como: radicais superóxido ($O_2^{\bullet-}$), hidroxila (HO^{\bullet}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). No mecanismo tipo II, ocorre transferência de energia para moléculas de oxigênio presentes no meio, gerando oxigênio singlete (forma excitada do oxigênio, altamente reativa). O oxigênio singlete é um poderoso oxidante, que pode reagir com diversos tipos de moléculas. Os dois mecanismos da TFD podem ocorrer simultaneamente (YAGHINI; SEIFALIAN; MACROBERT, 2009).

Figura 5 - Mecanismos da terapia fotodinâmica.



Legenda: **FS** – fotossensibilizador; **ROS** – espécies reativas de oxigênio.

Fonte: Adaptado de KISHEN; SHRESTHA; COHENCA (2014).

O superóxido pode reagir com ele próprio e produzir peróxido de hidrogênio, que pode passar facilmente através das membranas celulares, porém, não pode ser excluído das células. O superóxido também é importante na produção do radical hidroxila, que é altamente reativo. O superóxido pode reagir também com o radical hidroxila para formar também oxigênio singleto, ou com o óxido nítrico para produzir peroxinitrito, outra molécula oxidante altamente reativa. Essas espécies são agentes oxidantes que podem reagir diretamente com muitas moléculas biológicas. Por exemplo, os resíduos de aminoácidos, como cisteína, metionina, tirosina, histidina e triptofano são o principal alvo de um ataque oxidativo em proteínas. O DNA também pode sofrer dano oxidativo nas bases nitrogenadas e nos açúcares que fazem parte de suas cadeias. Embora as células tenham mecanismos de reparação do dano oxidativo de proteínas e DNA, o excesso de danos pode causar mutações ou morte celular (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

A destruição celular via geração de ROS, cujo ataque ocorre em múltiplos alvos torna improvável a ocorrência de resistência, um problema enfrentado por outras modalidades de tratamento (DUTTA; WAKI; CHANG, 2012). Apesar da existência de defesas naturais da célula contra produção de ROS, o efeito causado pela TFD é geralmente de maior magnitude que a proteção fornecida por espécies antioxidantes moleculares e enzimáticas. Além disso, enzimas celulares antioxidantes, como catalase e superóxido dismutase são inativadas pelo oxigênio singleto (BAPTISTA; WAINWRIGHT, 2011).

Fontes de luz laser e não-laser podem ser aplicados na TFD. Entre as fontes de luz não-laser são muito utilizados os diodos emissores de luz (LEDs - *Light Emitting Diodes*) (BRANCALEON; MOSELEY, 2002). A vantagem de utilizar lasers na TFD é a possibilidade de transmitir a luz através de fibras ópticas, e assim proporcionar a opção de tratamento de tumores em órgãos como a bexiga urinária, os brônquios, intestino, e o esôfago. Por outro lado, para a iluminação superficial, por exemplo, da pele, trato genital feminino, ou cavidade oral, o uso de LEDs também é indicado. Como os fotossensibilizadores não têm faixas de absorção muito estreitas, em geral, LEDs que apresentam larguras de banda de emissão de até cerca de 50 nm são totalmente aceitáveis como uma fonte de luz para tratamento superficial com TFD (SBEGHEN et al., 2015; SVANBERG et al., 2011).

Na TFD é importante também avaliar a distribuição espacial da luz e sua interação não somente com o fotossensibilizador mas também com o tecido alvo. Ao atingir o tecido, a luz pode ser tanto absorvida como sofrer espalhamento e a extensão de ambos processos depende do tipo do tecido e do comprimento de onda da luz utilizado (ROBERTSON; EVANS;

ABRAHAMSE, 2009). Primeiramente, a fonte de luz deve apresentar comprimentos de onda que estejam contidos dentro do espectro de absorção do fotossensibilizador para que ocorra geração de ROS suficiente para haver efeito citotóxico. Devem ser levados também em consideração, por exemplo, os pigmentos biológicos, tais como a melanina e a hemoglobina, que absorvem luz na região do visível. Adicionalmente, quanto maior é o comprimento de onda da luz, menor é seu espalhamento no tecido e regiões mais profundas podem ser atingidas. Assim, aspectos como esses devem ser avaliados para efetivar a ação da TFD de acordo com o objetivo proposto (BECHET et al., 2008). As lesões típicas da Leishmaniose Cutânea, por estarem dispostas na superfície corporal (MOTA; MIRANDA, 2011), não exigem, portanto, considerável penetração da luz no tecido para que ocorra eficácia da TFD, permitindo assim que uma gama maior de fotossensibilizadores e comprimentos de onda sejam avaliados.

Dessa forma, alguns fatores que podem influenciar na eficácia do processo fotodinâmico são: (i) a localização do alvo a ser tratado, (ii) a disponibilidade do oxigênio (o tratamento do câncer, por exemplo, pode ser menos efetivo, pois as células cancerígenas (tumores sólidos) muitas vezes estão em hipóxia), (iii) os parâmetros de irradiação que incluem o comprimento de onda de excitação, a taxa de fluência (W/cm^2) e a fluência (J/cm^2), (iv) o tempo de interação do sistema biológico com o fotossensibilizador, também chamado de tempo de incubação (em especial para os fotossensibilizadores que não apresentam boa biodistribuição) e (v) o tipo e a concentração do fotossensibilizador (SOUKOS; GOODSON, 2011). Portanto, um outro ponto que merece atenção é a escolha adequada do fotossensibilizador, que deve apresentar características que possam otimizar a formação de ROS, e assim, favorecer a eficácia da TFD.

2.2.2 Fotossensibilizadores

O sucesso da TFD depende, entre outros fatores, da escolha adequada de um fotossensibilizador (MOREIRA et al., 2012). São propriedades consideradas interessantes em um fotossensibilizador: estabilidade, facilidade de síntese e aplicação, baixa tendência à agregação, ausência de toxicidade no escuro, especificidade (seletividade entre tecido-alvo e tecido sadio), dispersão em meio aquoso, entre outras. A síntese de um fotossensibilizador deve ser relativamente fácil e os materiais de partida devem estar relativamente disponíveis para tornar a sua produção em larga escala viável. O uso de um fotossensibilizador em TFD depende ainda de sua eficiência para a transferência de energia e/ou de elétrons ao oxigênio

molecular e da subsequente produção de espécies reativas de oxigênio. Fotossensibilizadores positivamente carregados têm grande potencial de serem efetivos, pois podem se acumular em superfícies negativamente carregadas, como a da mitocôndria, e interagir mais facilmente com as membranas plasmáticas que também são negativamente carregadas (PAVANI et al., 2009).

No início da aplicação da TFD, apenas um número limitado de substâncias estava disponível para utilização como fotossensibilizador. Contudo, durante as duas últimas décadas, foram descobertas ou sintetizadas novas substâncias sendo as mesmas introduzidas para o uso na TFD (BENOV, 2015).

O Photofrin[®], um derivado da hematoporfirina, foi o primeiro fotossensibilizador aprovado para uso clínico na TFD (amplamente utilizado no tratamento de vários tipos de câncer e lesões pré-cancerígenas), fazendo parte da primeira geração de fotossensibilizadores. Entretanto, esses fotossensibilizadores estavam associados à baixa absorção de luz e provocavam efeitos colaterais como prolongada fotossensibilidade cutânea (O'CONNOR, A.E. GALLAGHER; BYRNE, 2009). A busca por novos compostos levou ao desenvolvimento de fotossensibilizadores de segunda geração (Levulan[®], Radachlorin[®], Visudyne[®] e Foscan[®]), os quais, comparados aos de primeira geração, apresentavam maior pureza química, melhor penetração nos tecidos e maior produção de ROS. Alguns desses são derivados de porfirina reduzidas, de benzoporfirinas, ftalocianinas e de naftalocianinas. Em 1999, a FDA (*US. Food and Drug Administration*) aprovou o uso do Levulan[®] Kerastick (ALA, ácido 5-aminolevulínico). O ácido 5-aminolevulínico é um precursor da protoporfirina IX, substância eficaz, utilizada como fotossensibilizador para o tratamento de ceratose actínica, carcinomas de células escamosas, doença de Bowen e candidíase. A terceira geração inclui fotossensibilizadores de 1^a e 2^a geração associados a outras moléculas, como anticorpos e nanopartículas, por exemplo. Porém, poucos fotossensibilizadores de terceira geração estão disponíveis comercialmente devido ao fato de existirem ainda poucos estudos que demonstrem sua aplicação clínica (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016).

Corantes fenotiazínicos como o azul de metileno e o azul de toluidina são fotossensibilizadores pertencentes ao grupo de fenotiazinas, que são bem conhecidos por demonstrarem atividade fotodinâmica eficaz contra uma vasta gama de microrganismos (TIM, 2015). Corantes xantenos como Rosa de Bengala e Eosina Y apresentam propriedades satisfatórias para TFD (baixo custo e alto rendimento na produção de ROS) (WANG et al., 2006).

Muitos agentes fotossensibilizadores são hidrofóbicos, e assim, facilmente formam agregados em meio aquoso. A presença de interações hidrofóbicas pode afetar as propriedades fotofísicas e biológicas do fotossensibilizador, comprometendo a sua capacidade de produzir ROS. A otimização da retenção do fotossensibilizador pelo tecido alvo também é outro desafio a ser vencido. O acúmulo do fotossensibilizador nas células alvo é necessário para promover os efeitos oxidantes. A sua seletividade também é um fator a ser levado em consideração, para reduzir danos às células saudáveis (BECHET et al., 2008). Os fotossensibilizadores podem ser entregues de maneira exógena (como as ftalocianinas, por exemplo) ou produzidos endogenamente (como algumas porfirinas), podem ainda ser direcionados a agentes causadores da doença ou células específicas, minimizando assim possíveis danos a tecidos vizinhos saudáveis (DUTTA; WAKI; CHANG, 2012).

Novos fotossensibilizadores têm sido desenvolvidos na busca de compostos mais eficientes. Nesse sentido, as porfirinas e seus derivados vêm demonstrando apresentar propriedades fotofísicas interessantes para uso como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica. Entretanto, ainda existem muitos aspectos a serem elucidados a respeito dos mecanismos envolvidos, como as relações entre a estrutura dos fotossensibilizadores, sua localização intracelular e o mecanismo de morte celular estimulado, os quais são importantes para a otimização da TFD (BENOV, 2015).

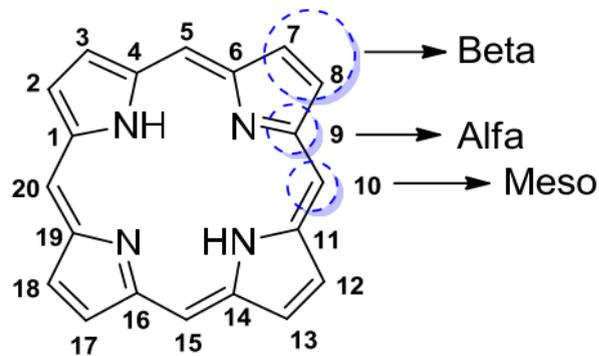
2.2.2.1 Porphirinas

Em 1924, Policard observou que porfirinas encontradas em altas concentrações em tumores malignos eram atóxicas, porém, na presença da luz visível e oxigênio, essas se tornavam extremamente prejudiciais ao tecido. As porfirinas são um grupo de compostos tetrapirrólicos cuja versatilidade sintética e propriedades fotofísicas são atraentes para a TFD. Essas moléculas estão envolvidas em uma série de papéis biologicamente importantes, incluindo o transporte de oxigênio, e possuem aplicações em vários campos, que vão desde agentes de imagens de fluorescência até seu emprego como fotossensibilizador (CALVETE; GOMES; MOURA, 2009; JOSEFSEN; BOYLE, 2012).

O núcleo base das porfirinas é constituído por quatro anéis pirrólicos ligados entre si por pontes metínicas (pontes de CH), formando um macrociclo composto por 20 átomos de carbonos e 4 átomos de nitrogênio (Figura 6). Os carbonos nas posições 5, 10, 15 e 20 são denominados “carbonos em posições *meso*”, enquanto os das posições 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17 e

18 são conhecidos como “carbonos nas posições β -pirrólicas” e os das posições 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 e 19 estão nas posições α -pirrólicas (MILGROM, 1997).

Figura 6 - Estrutura de uma porfirina de base livre.



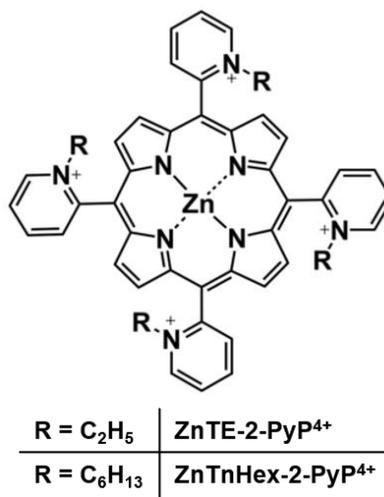
Fonte: OLIVEIRA et al., 2015.

De acordo com o tipo e posição dos substituintes, as porfirinas podem ser classificadas em alquilporfirinas (quando os substituintes se encontram nas posições *meso* e são alifáticos) e arilporfirinas (quando são aromáticos). Quando os substituintes das posições *meso* (carbonos 5, 10, 15 e 20) do anel porfirínico são iguais, usa-se o prefixo *tetrakis*. As porfirinas que apresentam dois átomos de hidrogênio ligados aos nitrogênios centrais são denominadas “porfirinas base-livre”, por outro lado, as porfirinas com íons metálicos em seu centro são conhecidas como metaloporfirinas. As metaloporfirinas resultam da troca dos dois átomos de hidrogênio centrais do anel da porfirina base livre por um cátion metálico como Cu^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} , Co^{2+} ou Ni^{2+} (PEIXOTO, 2012). A estrutura da porfirina oferece diversas possibilidades para modificações, que podem afetar a absorção, a distribuição e a fotoquímica de fotossensibilizadores (AL-MUTAIRI et al., 2006). Entre os fotossensibilizadores compostos por quatro anéis pirrólicos, as Zn(II) *N*-alquilpiridilporfirinas aparecem como um grupo promissor de fotossensibilizadores para se alcançar uma alta eficiência (BENOV et al., 2002). A adição de zinco no anel de porfirina tem sido frequentemente utilizada para estabilizar fotossensibilizadores derivados de porfirina, mantendo as propriedades fotofísicas necessárias para TFD (PAVANI et al., 2009). A introdução de zinco tem um efeito adicional de melhorar as características fotofísicas do fotossensibilizador, aumentando o tempo de vida do estado tripleto, e assim, ampliando a possibilidade de interação da molécula do fotossensibilizador ativado com o oxigênio ou alvos celulares (BENOV; CRAIK; BATINIC-HABERLE, 2011). Outra vantagem do uso de zincoporfirinas catiônicas como fotossensibilizador é que a sua carga positiva é considerada uma característica importante para a alta eficiência do

fotosensibilizador, devido a sua melhor interação com regiões negativamente carregadas da célula, como membrana plasmática e mitocôndrias (BENOV et al., 2002).

A estrutura tetrapirrólica oferece diversas possibilidades de substituição, o que permite a síntese de moléculas com diferentes propriedades (BENOV; CRAIK; BATINIC-HABERLE, 2012). A natureza dos substituintes ligados na periferia do anel porfirínico influencia na absorção e localização celular das Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinas (Figura 7). O aumento progressivo da cadeia alifática aumenta a lipofilicidade da molécula e melhora sua absorção celular, e conseqüentemente, também sua eficácia fotodinâmica (EZZEDDINE et al., 2013). A presença de cadeias alifáticas contendo um carbono (metil) garantem à molécula caráter mais hidrofílico, enquanto que, as cadeias contendo seis carbonos (*n*-hexil) tornam a zincoporfirina mais lipofílica. Dessa forma, a Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-etilpiridínio-2-il)porfirina (ZnTE-2-PyP⁴⁺) costuma localizar-se principalmente no citosol e lisossomos, enquanto a Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-*n*-hexilpiridínio-2-il)porfirina (ZnTnHex-2-PyP⁴⁺) localiza-se preferencialmente nas mitocôndrias e retículo endoplasmático (ODEH et al., 2014).

Figura 7 - Estrutura das Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinas.

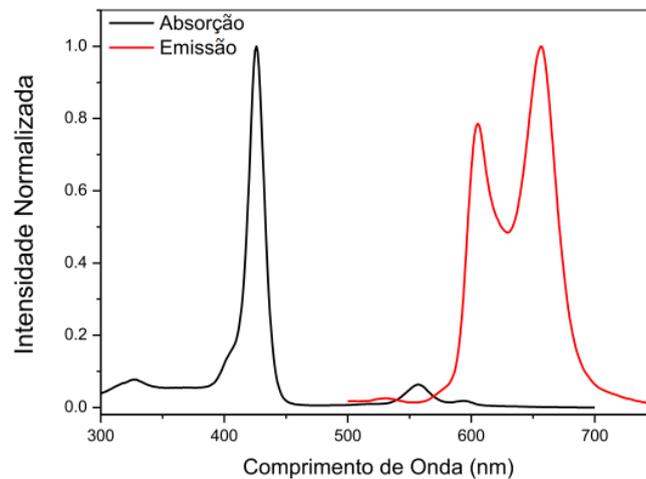


Fonte: Adaptado de EZZEDDINE et al., 2013.

A porfirinas possuem uma banda de absorção intensa em torno de 400 nm, conhecida como banda de Soret e, ainda, um conjunto de quatro bandas de menor intensidade localizadas entre 500 - 650 nm, denominadas bandas Q (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001). Devido ao aumento da simetria da molécula, os espectros de absorção das metaloporfirinas normalmente só apresentam três bandas, a banda de Soret e outras duas menos intensas, denominadas α e β , na região entre 500 e 800 nm (PEIXOTO, 2012). A

Figura 8 apresenta os espectros de absorção e emissão da ZnTE-2-PyP⁴⁺ (5 μM). É possível observar o pico de absorção em torno de 429 nm (que corresponde à banda de Soret) e duas bandas de emissão na região do vermelho com máximos em 606 nm e 656 nm (SANTOS, 2016).

Figura 8 - Espectros de absorção (em preto) e de emissão (em vermelho) da ZnTE-2-PyP⁴⁺ (5 μM) diluída em tampão fosfato-salino. Exc.: 450 nm.



Fonte: SANTOS, 2016.

As porfirinas e seus derivados têm sido alvo de interesse devido a suas diversas aplicações biológicas. Dentre essas aplicações, uma das mais importantes se encontra no campo da Medicina. Esses compostos (porfirinas de base livre e algumas metaloporfirinas) têm sido amplamente estudados como potenciais fotossensibilizadores. Suas propriedades fotofísicas e versatilidade sintética tornou-os componentes atraentes para a TFD (SWAVEY; TRAN, 2013).

Porfirinas e seus derivados têm sido usados com sucesso como fotossensibilizadores em TFD para o tratamento de doenças oncológicas, cardiovasculares, dermatológicas, oftálmicas e doenças infecciosas. Estudos recentes apontam que esses compostos podem ser eficazes na inativação de microrganismos, como vírus e bactérias, podendo se tornar uma alternativa potencial para o tratamento de infecções microbianas (CARVALHO et al., 2009).

Recentemente, foi descrita a atividade fotodinâmica da ZnTE-2-PyP⁴⁺ para inibição de *Escherichia coli* e *Candida albicans* (THOMAS et al., 2015; VIANA et al., 2015). Entretanto, acredita-se que o fato da ZnTnHex-2-PyP se acumular preferencialmente nas mitocôndrias torne esse fotossensibilizador mais eficiente na TFD do que seus análogos de cadeias mais curtas (ODEH et al., 2014). A ZnTnHex-2-PyP⁴⁺, que é 5 ordens de grandeza mais lipofílica

do que o seu análogo metil (ZnTM-2-PyP⁴⁺), revelou-se mais eficaz que esse análogo na indução de morte celular foto-dependente de células cancerosas em cultura. Ainda, foi observado que a ZnTnHex-2-Pyp⁴⁺ fotoinativa de maneira eficaz a citocromo *c* oxidase. Além de dificultar a produção de energia, a fotoinativação da citocromo *c* oxidase provoca a geração secundária de superóxido pela cadeia de transporte de elétrons, o que poderia atuar em conjunto com o dano fotodinâmico primário para conduzir a morte celular (EZZEDDINE et al., 2013).

Apesar das aplicações mais comuns da TFD associada a porfirinas e seus derivados serem na área oncológica, estudos publicados nos últimos anos sugerem que as porfirinas são moléculas com grande potencial fotossensibilizador para tratamento da Leishmaniose Cutânea (ABADA et al., 2013).

Os principais estudos *in vivo* sobre as porfirinas no tratamento da Leishmaniose Cutânea envolvem o uso do ácido aminolevulínico (ALA), que é utilizado como precursor da protoporfirina (PpIX) na via biossintética do grupo heme. Apesar de zincoporfirinas como ZnTM-2(3,4)PyP⁴⁺ e ZnTE-2-PyP⁴⁺ terem sido empregadas como fotossensibilizadores, tendo demonstrado a capacidade de matar bactérias patogênicas resistentes a antibióticos (BENOV et al., 2002; THOMAS et al., 2015), não há relatos na literatura do seu emprego para tratamento de parasitas do gênero *Leishmania*.

2.2.3 Terapia fotodinâmica no tratamento da Leishmaniose

Após a divulgação de resultados promissores da aplicação da TFD para tratamento de Leishmaniose Cutânea, seus efeitos vêm sendo investigados, tanto *in vitro* como *in vivo*, na tentativa de otimizar sua eficácia. Diversas condições de tratamento têm sido testadas, variando-se parâmetros como: tipo e concentração de fotossensibilizadores, tempo de irradiação, fluência, irradiância, etc (PINTO; SOARES; MITTMANN, 2011). Porém, esses dados ainda são limitados, dificultando a implementação dessa modalidade de tratamento na prática clínica de rotina. Além disso, o mecanismo de ação desta promissora modalidade terapêutica também precisa ser melhor investigado com fins de otimização da TFD (BASTOS et al., 2012).

Gardlo et al. reportaram, em 2003, o primeiro uso de TFD para tratamento de Leishmaniose Cutânea. No caso relatado pelos autores, um homem apresentava 10 lesões características da Leishmaniose Cutânea causada por *L. donovani*. Cinco dessas lesões foram tratadas com TFD utilizando Metvix[®] (forma esterificada do ALA), enquanto as cinco demais

lesões foram tratadas com sulfato de paromomicina. No grupo tratado com TFD, todas as lesões foram consideradas curadas de acordo com os critérios clínicos após 16 semanas de tratamento, o mesmo só aconteceu com duas das lesões tratadas com a terapia convencional. Porém, foram observados efeitos colaterais como eritema, sensação de queimação durante a iluminação e subsequente hiperpigmentação. No mesmo ano, Enk et al. (2003) descreveram o caso de 11 pacientes israelenses diagnosticados com Leishmaniose Cutânea causada por *L. major* (totalizando 32 lesões), que foram tratados com TFD semanalmente utilizando δ -ALA 10% e luz vermelha. Com exceção de uma lesão, todas as demais tornaram-se amastigota-negativas após apenas dois tratamentos, sendo os resultados cosméticos excelentes e não havendo recidivas durante os 6 meses de acompanhamento pós-tratamento. Asilan e Davami (2006) alcançaram a cura total de 29 e cura parcial de 2 das 31 lesões causadas por *L. major* e tratadas com TFD utilizando cloridrato de ácido 5-aminolevulínico 10%. Bristow et al. (2006) propuseram a inativação de formas promastigotas de *L. major* utilizando porfirinas catiônicas, porém, foi verificado efeito fototóxico superior nos macrófagos e queratinócitos testados.

Gardner et al. (2010) obtiveram resultados promissores empregando TFD combinada com acenftoporfirinas no tratamento da Leishmaniose. Apesar de apresentarem limitações em seu potencial devido a sua hidrofobicidade, nesse estudo as acenftoporfirinas foram veiculadas em lipossomas para que fossem entregues até as formas promastigotas de *L. tarentolae* e formas amastigotas de *L. panamensis*.

Peloi et al. (2011) e Sbeghen et al. (2015) apontam a TFD associada à aplicação tópica de azul de metileno e o uso de LED como fonte de luz como uma alternativa promissora para o tratamento de lesões de Leishmaniose Cutânea causada por *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em hamsters, além de apresentar a vantagem de ter baixo custo. Porém, embora o sistema de aplicação de TFD associada ao azul de metileno tenha apresentado resultados animadores, estudos ainda são necessários para melhor compreensão de seu mecanismo de ação e garantia de segurança e eficácia para uso em humanos.

Silva et al. (2015) descreveram o alto efeito fotodinâmico produzido por zincoftalocianinas sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. Contudo, o sistema de tratamento proposto não foi seletivo, mostrando-se danoso também para as células não-infectadas. Enk e colaboradores (2015) propuseram a aplicação da TFD, associada ao metil aminolevulinato 16% (m/v), ativada pela luz natural para tratamento de lesões causadas por *L. major* e *L. tropica* em humanos. Essa modalidade permite que o paciente realize o tratamento sem a necessidade de fontes de luz artificiais ou ambiente

hospitalar, seguindo apenas a orientação profissional. Porém, apesar dos resultados promissores, ainda há poucos estudos descritos na literatura que permitam a aplicação desse esquema terapêutico na prática clínica.

De maneira geral, a TFD é menos agressiva quando comparada aos tratamentos convencionais, que muitas vezes, requerem internação para monitoramento do paciente, aumentando os custos. Além disso, os efeitos estéticos são superiores aos tratamentos convencionais e apesar das repetidas aplicações, a TFD não induz o desenvolvimento de resistência. Os efeitos colaterais da TFD são raros, porém, alguns pacientes relataram desconforto relacionado a sensação de queimadura especialmente quando lasers foram utilizados como fontes de luz (AKILOV et al., 2007).

Estes estudos apontam a TFD como uma terapia promissora para a Leishmaniose Cutânea, contudo, também expõem a necessidade do desenvolvimento de uma melhor padronização de protocolos de tratamento antes do avanço para as aplicações na rotina clínica além da compreensão dos mecanismos de ação envolvidos nessa terapia, pois os mesmos deverão ajudar sua otimização. Dessa forma, a busca por fotossensibilizadores mais eficientes, bem como por esquemas de tratamento mais eficazes e seletivos continua, visando sempre a melhora do desempenho do tratamento da Leishmaniose Cutânea.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar *in vitro* o efeito da terapia fotodinâmica utilizando como fotossensibilizadores as Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinas sobre *Leishmania braziliensis*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Estabelecer parâmetros para a aplicação *in vitro* da TFD mediada por Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinas (ZnP) sobre *L. braziliensis*;
- Determinar a susceptibilidade da *L. braziliensis* à aplicação das Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinas na ausência de luz, à irradiação aplicada isoladamente, e por fim, à TFD mediada por ZnP;
- Investigar mecanismos de ação da TFD mediada por ZnP através da análise do fotodano celular verificado por citometria de fluxo (marcação com iodeto de propídio e rodamina 123) e microscopia eletrônica.
- Analisar o efeito citotóxico da TFD mediada por ZnP sobre células de mamíferos.

Fator de Impacto: 2,344, Qualis Capes: B2

Photochemical & Photobiological Sciences



PAPER



Cite this: *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2018, 17, 482

Photodynamic effect of zinc porphyrin on the promastigote and amastigote forms of *Leishmania braziliensis*†

C. G. Andrade,^a R. C. B. Q. Figueiredo,^b K. R. C. Ribeiro,^c L. I. O. Souza,^b J. F. Sarmento-Neto,^d J. S. Rebouças,^d B. S. Santos,^e M. S. Ribeiro,^f L. B. Carvalho Jr.^a and A. Fontes^g*^g

Leishmaniasis is a neglected disease present in more than 88 countries. The currently adopted chemotherapy faces challenges related to side effects and the development of resistance. Photodynamic therapy (PDT) is emerging as a therapeutic modality for cutaneous leishmaniasis. Zn(II) meso-tetrakis(*N*-ethylpyridinium-2-yl)porphyrin (ZnTE-2-PyP⁴⁺, ZnP) is a cationic, water-soluble, zinc porphyrin-based photosensitizer whose photodynamic effect on *Leishmania braziliensis* was analyzed by evaluating the number of visibly undamaged and motile cells, cell membrane integrity, mitochondrial membrane potential, and ultrastructural damage. Treatment of parasites with ZnP and light induced damage in up to 90% of *L. braziliensis* promastigote cells. Propidium iodide labeling suggested the loss of plasma membrane integrity. In samples treated with ZnP and light, a hyperpolarization of the mitochondrial membrane potential was also observed. Ultrastructural evaluation of promastigotes after photodynamic treatment indicated a loss of cytoplasmic material and the presence of vacuoles. Scanning electron microscopy showed wrinkling of the plasma membrane and a reduced cell volume. Additionally, the number of amastigotes per macrophage was reduced by about 40% after photodynamic application. The treatment showed no considerable toxicity against mammalian cells. Therefore, the results indicated that PDT associated with ZnTE-2-PyP⁴⁺ represents a promising alternative to cutaneous leishmaniasis treatment.

Received 20th December 2017.
Accepted 27th February 2018

DOI: 10.1039/c7pp00458c

rsc.li/pps

1. Introduction

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a neglected tropical disease, with clinical presentation of dermal manifestations. It represents up to 75% of all new and severe cases caused by *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. amazonensis*, or *L. braziliensis*.

The life cycle of the parasite involves two different forms: the promastigote, an extracellular form that is found in the vector, and the amastigote, an intracellular form found in mammalian host cells.¹ Although rarely fatal, the course of the disease is often accompanied by psychological and social repercussions, stigmatization, and disfiguration.²

Over the years, several drugs have been used to treat CL. The current treatment is based on pentavalent antimonials, amphotericin B, pentamidine, and paromomycin. However, the use of these drugs has some limitations, such as high levels of toxicity in humans, and the development of drug-resistant parasites has also been reported.³

Photodynamic therapy (PDT) appears as a promising option for leishmaniasis treatment, as it can offer rapid and localized destruction of the lesions, without affecting adjacent normal tissue.⁴ This therapeutic modality is based on the use of non-toxic dyes with photosensitizing properties, followed by light irradiation, to cause damage to the target tissue.⁵

The success of PDT depends, among other factors, on the choice of appropriate photosensitizer (PS).⁶ Porphyrins belong to a group of tetrapyrrole compounds that may possess the

^aLaboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^bDepartamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz (IAM-FIOCRUZ), Recife, PE, Brazil

^cDepartamento de Parasitologia, Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz (IAM-FIOCRUZ), Recife, PE, Brazil

^dDepartamento de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

^eDepartamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

^fCentro de Lasers e Aplicações, IPEN-CNEN/SP, São Paulo, SP, Brazil

^gDepartamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil. E-mail: adriana.fontes@pesquisador.cnpq.br

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c7pp00458c

5 EFEITO FOTODINÂMICO DA Zn(II) MESO-TETRAKIS(N-N-HEXILPIRIDINIO-2-IL)PORFIRINA SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania braziliensis*

5.1 BREVE INTRODUÇÃO

Os resultados promissores obtidos com a aplicação da TFD associada a ZnTE-2-PyP⁴⁺ nas formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* motivaram estudos com uma outra zincoporfirina, a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺, no tratamento desses parasitas. Devido ao caráter mais lipofílico dessa zincoporfirina, acredita-se que ela possa induzir um efeito fotodinâmico ainda mais eficaz sobre a *L. braziliensis*.

5.2 METODOLOGIA

5.2.1 Parasitas

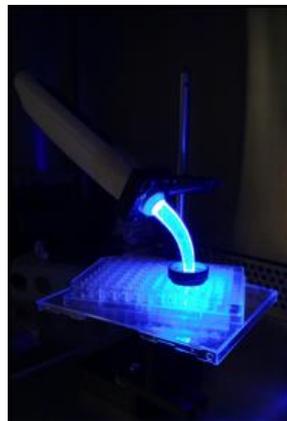
Formas promastigotas do parasita *L. braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) - gentilmente cedidas pela Profa. Regina Bressan (Instituto Aggeu Magalhães – FIOCRUZ) - foram cultivadas em meio Schneider (Sigma-Aldrich, EUA) suplementado com soro fetal bovino (SFB; Sigma-Aldrich) 10% de antibiótico (penicilina/estreptomicina; Sigma-Aldrich) 1% (v/v), a 26 °C, e utilizadas durante a fase exponencial de crescimento.

5.2.2 Ensaio fotodinâmico

Os experimentos de TFD foram realizados nas seguintes condições: em microplacas de 96 poços, foi adicionado por poço 100 µL da suspensão parasitária (1×10^7 células/mL) + 100 µL do sistema a ser testado. Como agente fotossensibilizador, foi utilizada a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ nas concentrações finais de 5 ou 10 µM, diluída em tampão fosfato-salino (PBS). A ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ foi gentilmente cedida pelo Prof. Júlio Rebouças (Depto. de Química – UFPB) sendo a concentração da solução-estoque determinada espectrofotometricamente utilizando a absorvidade molar da banda Soret ($\epsilon_{425\text{nm}} = 436.500 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$). Os parâmetros de irradiação foram baseados nos ensaios realizados anteriormente utilizando a ZnTE-2-PyP⁴⁺ (ANDRADE et al., 2018). As células foram incubadas com o fotossensibilizador durante 10 min. Como fonte de luz, foi utilizado um LED $455 \pm 20 \text{ nm}$ (LEC fotopolimerizador, MMOptics, Brasil) com irradiância *ca.* 300 mW/cm^2 . Como descrito por

Andrade e colaboradores (2018), os testes anteriores realizados com a ZnTE-2-PyP⁴⁺ revelaram que não houve diferença significativa na quantidade de células danificadas quando aplicado 5 ou 10 min de irradiação. Dessa forma, optou-se por testar um tempo de irradiação inferior aos testados anteriormente. Assim, nos poços referentes aos grupos que receberam tratamento com luz, foram utilizados os tempos de irradiação de 2 ou 5 min por poço, sendo a irradiação aplicada diretamente no topo na placa, isso é, na ausência da tampa da mesma (Figura 9). Para irradiação, as amostras foram dispostas em poços equidistantes, de forma que a irradiação de um poço não interferisse nos demais poços testados. Nos poços referentes aos grupos Controle, ZnP 5 μ M e ZnP 10 μ M não houve irradiação.

Figura 9 – Esquema de irradiação.



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Após os respectivos tratamentos, foram realizadas contagens em câmara de Neubauer, considerando-se apenas as células que se mostravam íntegras e preservaram a motilidade (ALIANÇA et al., 2014). Os experimentos foram realizados em triplicata em dois ensaios independentes. As análises de significância ($p < 0,05$) foram realizadas através do teste t-student para amostras independentes utilizando o GraphPad Prism 5 (Graphpad, Califórnia, EUA). Ainda, foram obtidas imagens de microscopia de contraste de fase para observação de danos na morfologia celular. Para tal, alíquotas de 10 μ L foram coletadas de cada poço após o respectivo tratamento e dispostas em lâminas tratadas previamente com poli-L-lisina. As imagens foram adquiridas em microscópio Leica DMI4000B utilizando a objetiva de 63X.

5.2.3 Marcação com iodeto de propídio

Após o tratamento, as amostras foram lavadas 2x em PBS e em seguida incubadas com 30 μ g/mL de iodeto de propídio (IP; Sigma-Aldrich) durante 15 minutos. Células tratadas

com dimetilsulfóxido (DMSO) durante 10 min foram utilizadas como controle positivo de morte. Após a marcação, as células foram lavadas 3x em PBS, ressuspensas e analisadas no citômetro de fluxo Accuri C6. Foram adquiridos 20.000 eventos usando o detector 582/42 nm (FL2).

5.2.4 Detecção de alteração do potencial de membrana mitocondrial

Possíveis alterações do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_M$) induzidas pelo tratamento foram analisadas utilizando o marcador rodamina 123 (Rh 123; Sigma-Aldrich). Após o tratamento com TFD, as células foram lavadas 2x e ressuspensas em PBS e, em seguida, foram incubadas com Rh 123 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) durante 15 minutos. Células tratadas com DMSO durante 10 min foram mais uma vez utilizadas como controle positivo de morte. Após esse período, as células foram lavadas 3x em PBS, ressuspensas e analisadas no citômetro de fluxo Accuri C6. Foram adquiridos 20.000 eventos usando o detector 533/30 nm (FL1). As alterações na fluorescência da Rh 123 foram quantificadas utilizando o índice de variação (IV), obtido através da equação $(MT-MC)/MC$, onde MT é a mediana da fluorescência dos parasitas tratados e MC é a mediana de fluorescência dos parasitas controle. Valores IV negativos correspondem à despolarização da membrana mitocondrial (FONSECA-SILVA et al., 2011).

5.2.5 Ensaio de citotoxicidade

O efeito citotóxico do tratamento, foi avaliado através de um ensaio de citotoxicidade frente a célula de mamíferos, utilizando como modelo celular macrófagos J774.A1. As células (1×10^6 células/mL) foram incubadas *overnight* em placas de 96 poços, contendo meio RPMI sem vermelho de fenol, suplementado com SFB 10%, à 37 °C e 5% de CO₂. Para o ensaio, o sobrenadante foi retirado dos poços e foi acrescentada ZnP numa concentração final de 5 ou 10 μM (com exceção das amostras do grupo controle e tratadas apenas com luz). A irradiação seguiu o mesmo protocolo utilizado para tratamento dos parasitas, descrito anteriormente. Após o tratamento, o sobrenadante foi retirado e adicionou-se 10 μL de MTT 5 mg/mL e 100 μL de meio RPMI por poço. As placas foram então incubadas por 3 h, à 37 °C e 5% de CO₂. Após a incubação, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se 100 μL de DMSO por poço. A absorbância das amostras foi analisada a 490 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata, em dois ensaios independentes.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

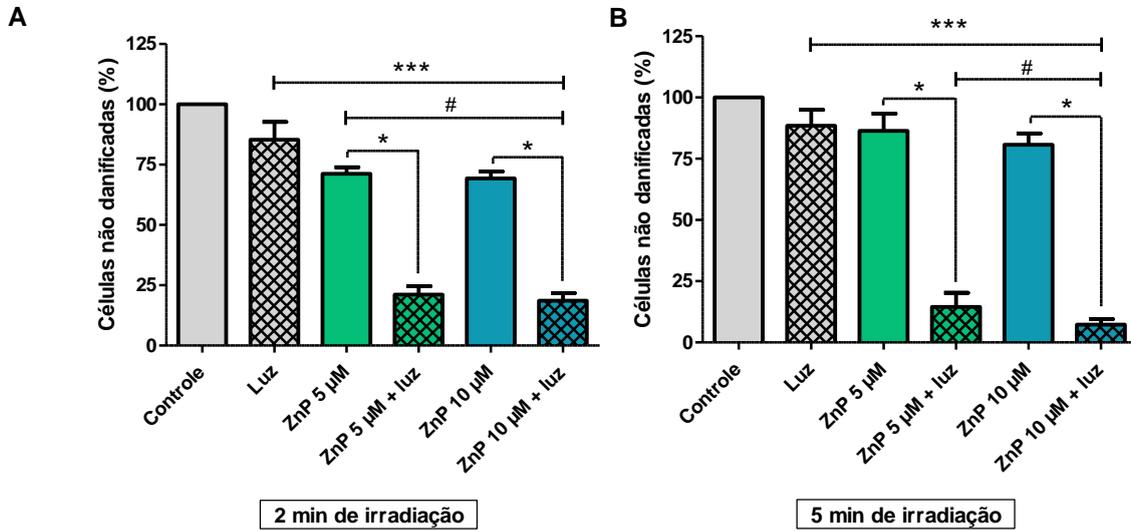
5.3.1 Efeito da terapia fotodinâmica em formas promastigotas

O efeito fotodinâmico da ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ sob formas promastigotas de *L. braziliensis* está representado na Figura 10. É possível observar que mais de 75% das células incubadas com a zincoporfirina e mantidas no escuro, bem como células expostas à luz durante 2 ou 5 min (na ausência de porfirina), não se mostraram danificadas. Sua ação como fotossensibilizador empregado na inativação de microrganismos havia sido demonstrada anteriormente por Moghnie et al. (2017), que investigaram a ação de Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinas na TFD antifúngica.

Por outro lado, os resultados da contagem das promastigotas demonstraram que nos grupos relativos a TFD observou-se a maior indução de dano celular. Quando utilizado 5 min de irradiação, verificou-se que houve diferença significativa entre as duas concentrações de ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ testadas. Nesse caso, quanto maior a concentração utilizada, maior o número de células promastigotas danificadas após a TFD. Para 2 min de irradiação não houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas. A maior quantidade de células danificadas foi observada quando a TFD foi aplicada de acordo com os seguintes parâmetros: incubação com a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 10 µM seguido de 5 min de irradiação. A utilização desses parâmetros de tratamento foi capaz de danificar cerca de 93% das promastigotas. Foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dois tempos de irradiação testados, sendo possível observar que quanto menor o tempo de irradiação utilizado, menor a quantidade de células danificadas. A diferença foi ainda mais significativa ($p < 0,0001$) para a maior concentração utilizada.

Apesar das zincoporfirinas ZnTE-2-PyP⁴⁺ e ZnTnHex-2-PyP⁴⁺, ambas a 10 µM, causarem dano semelhante nas promastigotas, os resultados mostram que a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ parece ser mais eficiente na indução de dano celular que a ZnTE-2-PyP⁴⁺ quando a menor concentração foi utilizada (5 µM). Por exemplo, comparando os efeitos de ZnTE-2-PyP⁴⁺ e ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ e considerando a aplicação de 5 min de irradiação, verifica-se que, a concentração de 5 µM da ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ foi suficiente para causar dano em 86% das células, enquanto o efeito do análogo etil atingiu 63% das promastigotas. Mesmo quando aplicado menor tempo de irradiação (2 min), o dano causado pela ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 5 µM (79% de células danificadas) foi superior ao dano causado pela incubação com ZnTE-2-PyP⁴⁺ 5 µM seguido de 5 min de irradiação (68% de células danificadas).

Figura 10 – Percentual de células promastigotas de *L. braziliensis* danificadas após aplicação da terapia fotodinâmica associada a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ (ZnP) com diferentes tempos de irradiação: 2 min (A) ou 5 min (B).



Nota: Grupos estatisticamente significativos quando comparados ao controle (***) $p < 0,01$, ao tratamento com luz (#; $p < 0,05$) e ZnP no escuro (*; $p < 0,0001$).

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

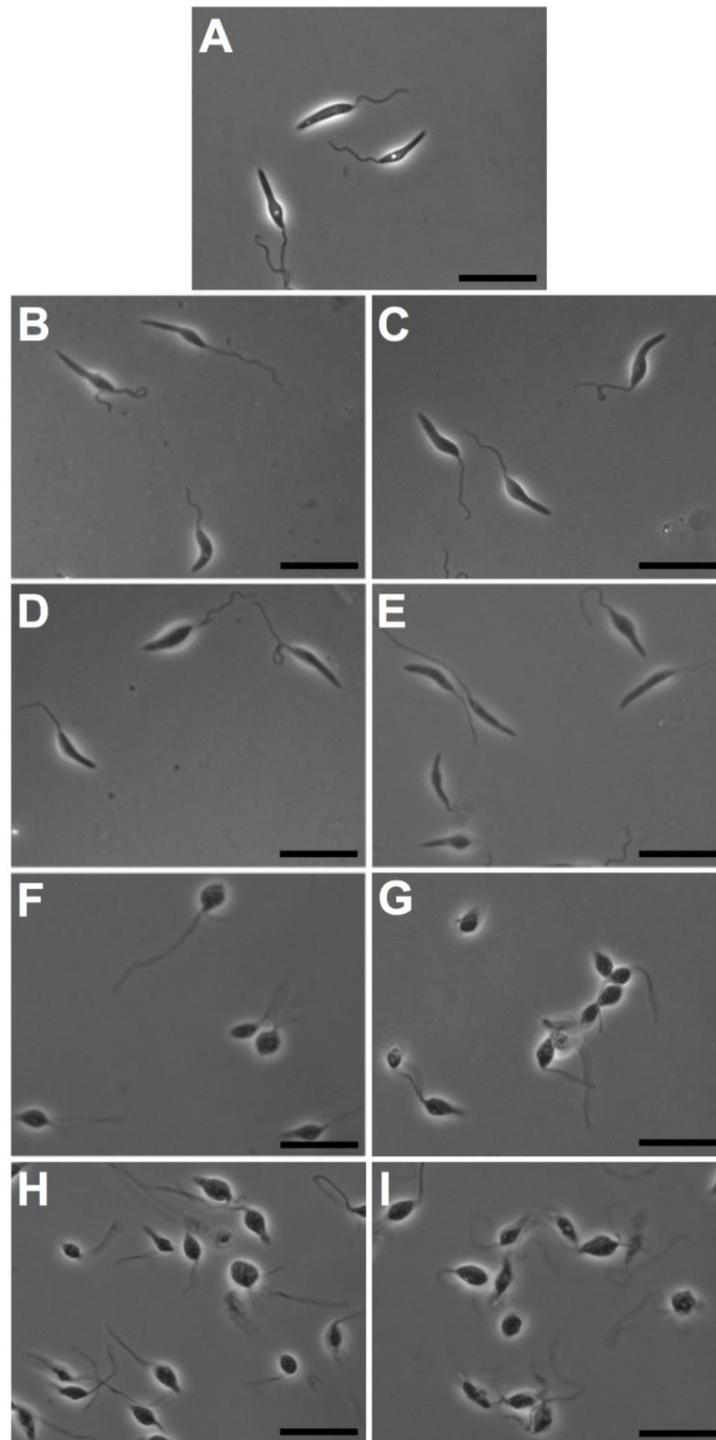
Danos celulares e suas consequências, incluindo a indução e a execução de vias de morte celular, dependerão da localização do fotossensibilizador. Aqueles que se acumulam nas mitocôndrias tendem a ser mais eficientes em matar células do que os que se localizam em outros locais na célula. O fotossensibilizadores que causam danos principalmente nos lisossomos, como a ZnTE-2-PyP⁴⁺, promovem a liberação de enzimas lisossômicas capazes de induzir a morte celular. Porém, a eficácia relativa desses fotossensibilizadores é menor que aqueles que têm como alvo celular as mitocôndrias ou a membrana plasmática. Provavelmente, esse fato se deve a fotoativação de enzimas lisossômicas e/ou sua inibição por inibidores citosólicos (EZZEDDINE et al., 2013).

Resultados descritos na literatura indicam que a lipofilicidade das Zn(II) meso-tetrakis(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinas é aumentada em aproximadamente uma ordem de grandeza para cada porção CH₂ introduzida na cadeia lateral alifática e o alongamento da cadeia alquil aumenta a atividade fotodinâmica da zincoporfirina. O caráter anfifílico da ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ faz com que esse fotossensibilizador seja absorvido pelas células mais efetivamente do que seus análogos de cadeia curta (mais hidrofílicos), o que pode resultar em maiores concentrações intracelulares. Essa absorção celular mais eficiente dos compostos anfifílicos seria um fator importante que contribui para uma maior eficácia da TFD (ODEH

et al., 2014). Moghnie et al. (2017) reportaram que a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ foi mais eficiente na fotoinativação de *Saccharomyces cerevisiae* quando comparado ao seu análogo metil.

Na Figura 11, observa-se a morfologia das células após o tratamento fotodinâmico associado a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺. Verifica-se que as células tratadas com a zincoporfirina na ausência de luz e células tratadas apenas com luz (2 ou 5 min de irradiação) preservaram as características morfológicas verificadas nas células do grupo controle, como formato fusiforme e flagelo evidente. Entretanto, as células dos grupos tratados com TFD apresentaram perda do formato fusiforme e evidente arredondamento do corpo celular, independentemente da concentração de zincoporfirina ou tempo de irradiação utilizados. Tais alterações também foram reportadas anteriormente por Pinto et al. (2016) após TFD com curcumina em formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. major*. O arredondamento do corpo celular e redução do volume celular também foram observados anteriormente, através de microscopia eletrônica de varredura após a aplicação da TFD associada a ZnTE-2-PyP⁴⁺. Essas alterações morfológicas sugerem que TFD associada a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ pode ter afetado a camada de microtúbulos localizada abaixo da membrana plasmática do parasita, responsável pela sua forma fusiforme (WALLER; MCCONVILLE, 2002).

Figura 11 – Aspecto morfológico, observado sob microscopia de contraste de fase, das promastigotas de *L. braziliensis* submetidas à TFD.



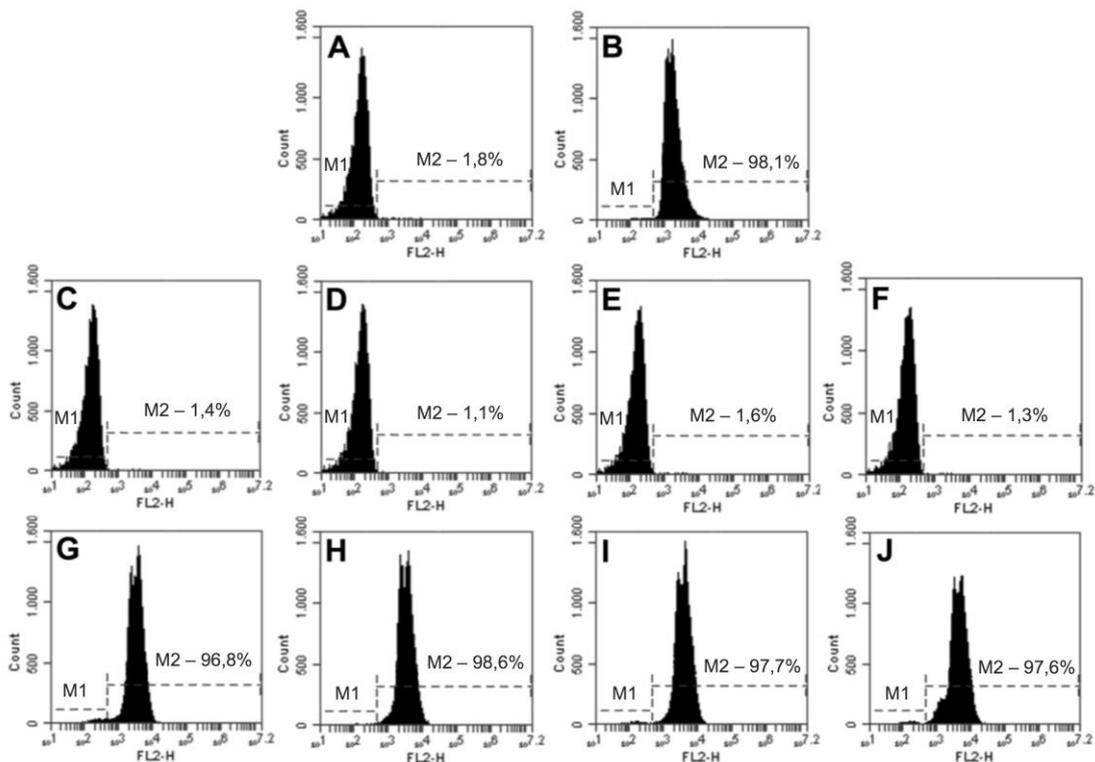
Legenda: **A** – Controle; **B** – Luz 2 min; **C** – Luz 5 min; **D** – ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 5 μM; **E** – ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 10 μM; **F** – ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 5 μM + luz 2 min; **G** – ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 5 μM + luz 5 min; **H** – ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 10 μM + luz 2 min; **I** – ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 10 μM + luz 5 min. Barra de escala: 25 μm.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

5.3.2 Avaliação da integridade da membrana celular

A fluorescência do IP é detectada em células que perderam a integridade da membrana plasmática, pois a ruptura da membrana permite a entrada desse marcador e sua ligação ao DNA da célula (SCARIOT et al., 2017). A Figura 12 mostra as análises citométricas da marcação com IP das formas promastigotas de *L. braziliensis* submetidas à TFD. Apenas 1,7% das células do grupo controle negativo (sem tratamento) apresentaram-se marcadas pelo IP (Figura 12A). Nível semelhante de marcação foi observado nas células tratadas apenas com a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ (5 ou 10 μM) ou células tratadas apenas com luz (2 ou 5 min e irradiação) (Figura 12C-F). Por outro lado, mais de 98% das células tratadas com DMSO (controle positivo) apresentaram marcação pelo IP (Figura 12B), assim como as células dos grupos tratados com TFD, que exibiram acima de 95% de fluorescência do IP (Figura 12G-J).

Figura 12 – Análise por citometria de fluxo da marcação com iodeto de propídio de formas promastigotas submetidas à TFD associada a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺.



Legenda: **A** – Controle negativo; **B** – DMSO (controle positivo); **C** – Luz 2 min; **D** – Luz 5 min; **E** – ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 5 μM; **F** – ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 10 μM; **G** – ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 5 μM + luz 2 min; **H** – ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 5 μM + luz 5 min; **I** – ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 10 μM + luz 2 min; **J** – ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 10 μM + luz 5 min.

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

A detecção da fluorescência do IP é possível após sua ligação a ácidos nucleicos, o que não ocorre em membranas plasmáticas intactas ou mesmo em membranas de células em estágio inicial da apoptose (GOULD et al., 2008). Dessa forma, o IP é um corante que marca células necróticas e células em apoptose tardia, pois essas possuem uma membrana plasmática penetrável (GREKOV et al., 2017). A natureza das estruturas danificadas e a extensão do dano determinam o mecanismo predominante de morte celular, que por sua vez é um grande preditor do desfecho da TFD (EZZEDDINE et al., 2013). De acordo com a marcação apresentada, é possível afirmar que todas as condições de TFD testadas foram capazes de induzir a perda da permeabilidade da membrana em acima de 95% das células promastigotas, indicando que as mesmas tiveram sua viabilidade comprometida. Mesmo utilizando a concentração mais baixa de ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ (5 µM) e o menor tempo de irradiação (2 min), o dano causado por essa zincoporfirina na integridade da membrana plasmática foi superior àquele observado para a ZnTE-2-PyP⁴⁺. Os resultados da marcação com IP indicam que provavelmente até mesmo as células visualmente íntegras e móveis poderiam estar com a permeabilidade da membrana comprometida. Destaca-se ainda que, moléculas mais lipofílicas podem ser internalizadas mais facilmente pelas células (AWAD et al., 2016). Dessa forma, os resultados sugerem que, já que não foram observadas diferenças consideráveis entre os grupos tratados com zincoporfirinas + luz (considerando ambas concentrações e tempos de irradiação utilizados), concentrações ainda menores que 5 µM de ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ deveriam ser testadas, uma vez que podem levar a danos celulares equivalentes aos apresentados. Moghnie et al. (2017) observaram que, em concentrações inferiores a 5 µM, a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ se mostrou um agente antifúngico ainda mais potente que a clorina e6 (comercialmente disponível), sendo capaz de reduzir consideravelmente a viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae*.

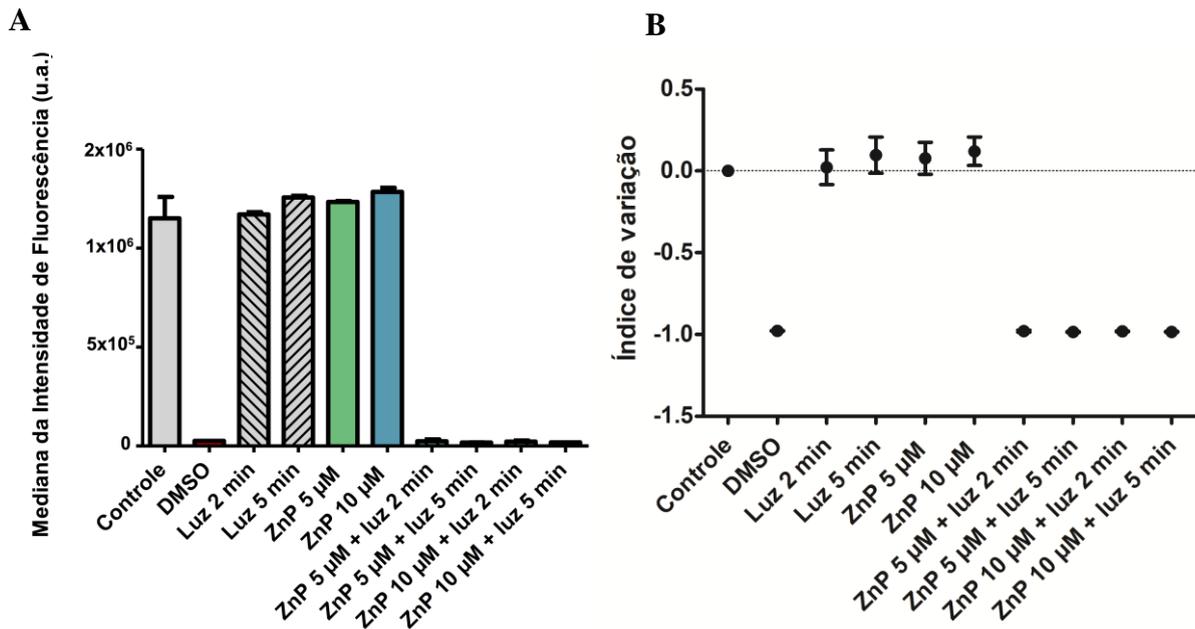
5.3.3 Análise da alteração do potencial de membrana mitocondrial

A Rh 123 é um marcador capaz de se acumular dentro da membrana da mitocôndria polarizada, fato que evita a eliminação do marcador. Por outro lado, a diminuição da fluorescência da Rh 123 indica a despolarização da membrana mitocondrial (SCARIOT et al., 2017). Os resultados das alterações mitocondriais obtidos através do ensaio com a Rh 123 são apresentados na Figura 13.

Todas as amostras de promastigotas tratadas com TFD demonstraram importantes alterações mitocondriais de acordo com a análise de citometria de fluxo usando Rh 123. A

mediana de intensidade de fluorescência da Rh 123 apresentou uma forte diminuição nas amostras tratadas com TFD associada a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺. Porém, não foi observado modificação na mediana de intensidade de fluorescência nas células tratadas apenas com ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ ou luz, independentemente do tempo de irradiação utilizado (Figura 13A). Verificou-se ainda valores negativos de IV para todos os grupos nos quais aplicou-se a TFD (Figura 13B). Observou-se a ocorrência de uma despolarização intensa nos grupos tratados com DMSO e ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ + luz, evidenciado pelo valor negativo do IV ($IV \approx -0,98$ para os grupos citados). Dessa forma, o dano mitocondrial induzido pela TFD foi confirmado pela diminuição da fluorescência da Rh 123 e observação de valores negativos de IV, os quais indicam que houve alteração no $\Delta\Psi_M$.

Figura 13 – Análise de alterações mitocondriais: mediana da fluorescência da Rh 123 em células tratadas com TFD associada a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ (A) e índice de variação das células tratadas com TFD associada a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ (B).



Fonte: Elaborado pela autora (2018).

As alterações mitocondriais podem ser uma consequência de efeitos induzidos por ROS e o estresse oxidativo parece ser decisivo para a morte celular. A mitocôndria única do parasita é um alvo terapêutico atraente, pois suas características funcionais são marcadamente distintas das mitocôndrias de mamíferos. Portanto, a verificação da possibilidade que o tratamento aplicado tem de causar danos mitocondriais em protozoários Kinetoplastea é interessante do ponto de vista da seletividade. Essa organela é muito peculiar

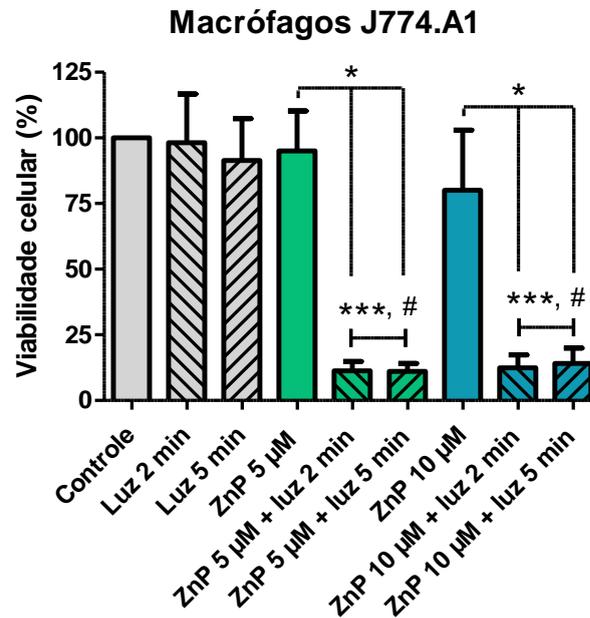
nesse grupo de protozoários e as diferenças mitocondriais entre protozoários e células de mamíferos permite com que estas sejam afetadas de maneiras distintas pelo tratamento aplicado (BRITTA et al., 2014). A defesa antioxidante intracelular de *Leishmania spp.* é totalmente dependente do sistema tripanotona, porque estes protozoários não apresentam catalase e outras enzimas com atividade antioxidante. Assim, o aumento do estresse oxidativo para este protozoário é um caminho interessante a ser atacado, uma vez que as células de mamíferos parecem ter um sistema de defesa antioxidante intracelular mais complexo (SCARIOT et al., 2017).

Os resultados revelaram que o tratamento da TFD associada a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ induziram uma disfunção mitocondrial ocasionada pela severa despolarização da mesma. Por outro lado, quando a ZnTE-2-PyP⁴⁺ foi utilizada no tratamento das células, foi observada uma hiperpolarização da membrana mitocondrial (IV = +0.45). Esse fato provavelmente se deve a localização diferente desses fotossensibilizadores na célula. O ¹O₂ gerado no processo da TFD tem um tempo de vida útil curto e, portanto, os danos são causados preferencialmente em estruturas próximas ao local de acúmulo do fotossensibilizador. Enquanto as zincoporfirinas hidrofílicas, como a ZnTE-2-PyP⁴⁺, demonstraram principalmente distribuição lisossomal, os derivados hexil, que apresentam caráter anfifílico, foram associados a mitocôndrias, retículo endoplasmático e membrana plasmática. Muito pouco da zincoporfirina hidrofílica é acumulada pelo retículo endoplasmático ou mitocôndria. Porém, aumentando o comprimento da cadeia de carbono, aumenta-se a interação da ZnP ao retículo endoplasmático e mitocôndria (EZZEDDINE et al., 2013; ODEH et al., 2014).

5.3.4 Efeito Citotóxico

Na Figura 14, observa-se que nos grupos tratados apenas com luz (durante 2 ou 5 min) ou com as soluções de ZnP 5 ou 10 µM no escuro mais de 80% dos macrófagos J774.A1 se mantiveram viáveis. As amostras fotodinamicamente tratadas apresentaram redução da viabilidade mais acentuada. Nesses grupos, foi observado menos de 20% de células viáveis. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o tratamento com ZnP 5 ou 10 µM ou quando aplicados tempo de irradiação de 2 ou 5 min.

Figura 14 – Efeito citotóxico da TFD sobre macrófagos J774.A1.



Nota: Grupos estatisticamente significativos ($p < 0,0001$) quando comparados ao controle (***), ao tratamento com luz (#) e ZnP no escuro (*).

Fonte: Elaborado pela autora (2018).

Benov et al. (2012) observaram, através do teste do MTT, a supressão do metabolismo celular após irradiação ($0,5 \text{ mW/cm}^2$) de células cancerígenas LS174T incubadas previamente com zincoporfirinas por 24 h. O efeito fotodinâmico associado a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ 10 µM foi capaz de reduzir a viabilidade celular a níveis inferiores a 5%. Quando utilizados os análogos butil e metil, na mesma concentração, a viabilidade celular foi reduzida a 10% e 20%, respectivamente. Acredita-se que nessas células ocorra inativação de enzimas de vias metabólicas como glicólise e ciclo de Krebs, comprometendo a produção de energia pela célula (AL-MUTAIRI et al., 2007).

Apesar da toxicidade observada para ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ + luz em macrófagos J774.A1, é importante destacar que o emprego da TFD para o tratamento de infecções localizadas poderá ser realizado através da aplicação local do fotossensibilizador na área afetada por métodos como a aplicação tópica, reduzindo o dano no tecido sadio adjacente.

5.4 CONCLUSÕES

O tratamento fotodinâmico associado a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ mostrou-se capaz de foto-inativar células promastigotas de *L. braziliensis*, induzindo dano expressivo na integridade da membrana celular, despolarização no potencial de membrana mitocondrial e modificações morfológicas como perda da forma fusiforme e evidente arredondamento do corpo celular. Os dados observados estão de acordo com estudos da literatura que mostram que zincoporfirinas anfifílicas com cadeias mais longas, como a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺, demonstraram efetiva atividade antibacteriana e antifúngica. Moléculas com maior lipofilicidade apresentam como vantagem o fato de serem internalizadas mais facilmente pelas células, possibilitando a avaliação do uso de menores concentrações do fotossensibilizador para inativação do parasita e redução da toxicidade do tratamento frente a células de mamíferos. Este estudo demonstra que os fotossensibilizadores catiônicos à base de porfirina com propriedades anfifílicas podem atuar de maneira eficiente na aplicação da TFD em células de protozoários.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação da TFD associada às Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinas induziu danos em mais de 90% dos parasitas quando comparado ao controle. O maior percentual de dano celular nas promastigotas foi observado ao utilizar como fotossensibilizador a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺. Acredita-se que isso tenha ocorrido devido ao caráter anfifílico desse fotossensibilizador, o que influencia na sua absorção pela célula. Os ensaios confirmaram que, para ambas as Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinas, a utilização do fotossensibilizador seguido de irradiação foi mais eficiente quando comparado a esses tratamentos aplicados de forma isolada. Tanto a ZnTE-2-PyP⁴⁺ como a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ foram capazes de provocar aumento da permeabilidade da membrana celular, fato que foi verificado através da marcação com iodeto de propídio, que se mostrou mais acentuada nas células tratadas com TFD associada a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺.

Verificou-se ainda a presença de danos celulares, a nível ultraestrutural, que comprovam o efeito fotodinâmico da ZnTE-2-PyP⁴⁺ sobre o parasita. A análise das ultraestruturas de promastigotas após a TFD associada a ZnTE-2-PyP⁴⁺ mostrou que as células apresentaram fotodanos como intensa perda de material citoplasmático, surgimento de vacúolos, enrugamento da membrana plasmática e redução do volume celular. A microscopia de contraste de fase também evidenciou a redução do volume celular induzido pela TFD associada a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺.

A alteração no $\Delta\Psi_M$ após o tratamento fotodinâmico associado a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ indicou a ocorrência de uma despolarização da membrana mitocondrial, enquanto ZnTE-2-PyP⁴⁺ uma hiperpolarização. O alongamento da cadeia lateral do substituinte aumentou também a toxicidade frente a células de mamífero, sendo a ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ mais tóxica que a ZnTE-2-PyP⁴⁺. A aplicação da ZnTE-2-PyP⁴⁺ na TFD foi capaz de reduzir a quantidade de formas amastigotas em *ca.* 40%.

Uma vez que a Leishmaniose representa um grave problema de saúde pública, esforços no sentido de desenvolver terapias alternativas e eficazes devem ser valorizados e incentivados. Ainda há muito a ser estudado para melhor compreender a erradicação do parasita utilizando zincoporfirinas e terapia fotodinâmica, porém, destaca-se que o conjunto de resultados obtidos permite apontar que tanto a ZnTE-2-PyP⁴⁺ como ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ apresentam potencial para serem empregadas no tratamento fotodinâmico da Leishmaniose Cutânea.

Uma melhor compreensão em relação aos locais de acúmulo e consequente atuação do fotossensibilizador na célula, das características que favorecem a distribuição e a interação dessas substâncias com o sistema alvo são essenciais para o desenvolvimento de tratamentos com alta eficiência e efeitos colaterais mínimos.

7 PERSPECTIVAS

- Avaliar o efeito fotodinâmico induzido por concentrações inferiores a 5 μM de ZnTnHex-2-PyP⁴⁺.
- Aprimorar as condições de tratamento da forma amastigota (testar o efeito do aumento do tempo de incubação das células com as Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinas, avaliar a eficácia do tratamento aplicando irradiações sucessivas).
- Através da microscopia confocal, monitorar a localização das Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-alquilpiridínio-2-il)porfirinas na célula.
- Comparar localização celular e efeitos fotodinâmicos das zincoporfirinas ZnTE-2-PyP⁴⁺ e ZnTnHex-2-PyP⁴⁺, com fins de compreender mecanismos de ação desses fotossensibilizadores.
- Avaliar o dano ultra-estrutural induzido pela ZnTnHex-2-PyP⁴⁺ nas promastigotas através de microscopia eletrônica de transmissão e varredura.

REFERÊNCIAS

- ABADA, Z. et al. Synthesis and antiprotozoal activity of original porphyrin precursors and derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 67, p. 158–165, 2013.
- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016.
- ANDRADE, C. G. et al. Photodynamic effect of zinc porphyrin on the promastigote and amastigote forms of *Leishmania braziliensis*. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 17, p. 482–490, 2018.
- AKILOV, O. E. et al. Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. **Experimental Dermatology**, v. 16, p. 651–660, 2007.
- AL-MUTAIRI, D. A et al. Photosensitizing action of isomeric zinc N-methylpyridylporphyrins in human carcinoma cells. **Free Radical Research**, v. 40, n. 5, p. 477–483, 2006.
- AL-MUTAIRI, D. A. et al. Inactivation of metabolic enzymes by photo-treatment with zinc meta N-methylpyridylporphyrin. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1770, p. 1520–1527, 2007.
- ALIANÇA, A. S. DOS S. et al. The in vitro biological activity of the Brazilian brown seaweed *Dicotyta mertensii* against *Leishmania amazonensis*. **Molecules**, v. 19, p. 14052–14065, 2014.
- ASILAN, 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. **Clinical Experimental Dermatology**, v. 31, p. 634–637, 2006.
- AWAD, M. M. et al. Important cellular targets for antimicrobial photodynamic therapy. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 17, p. 7679–7688, 2016.
- BAPTISTA, M. S.; WAINWRIGHT, M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT) for the treatment of malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 44, n. 1, p. 1–10, 2011.
- BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, 2004.
- BASTOS, M. M. et al. O uso de porfirinas em terapia fotodinâmica no tratamento da leishmaniose cutânea. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 257–267, 2012.
- BECHET, D. et al. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 612–621, 2008.
- BENOV, L. et al. Isomeric N-alkylpyridylporphyrins and their Zn(II) complexes: Inactive as SOD mimics but powerful photosensitizers. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 402, p. 159–165, 2002.
- BENOV, L. Photodynamic therapy: Current status and future directions. **Medical Principles and Practice**, v. 24, n. suppl 1, p. 14–28, 2015.

BENOV, L.; CRAIK, J.; BATINIC-HABERLE, I. The potential of Zn(II) N-alkylpyridylporphyrins for anticancer therapy. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 233–241, 2011.

BENOV, L.; CRAIK, J.; BATINIC-HABERLE, I. Protein damage by photo-activated Zn(II) N-alkylpyridylporphyrins. **Amino Acids**, v. 42, p. 117–128, 2012.

BERLANDA, J. et al. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 100, p. 173–180, 2010.

BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers in Medical Science**, v. 17, n. 3, p. 173–186, 2002.

BRISTOW, C.-A. et al. Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis. **Photodiagnosis and Photodynamic therapy**, v. 3, p. 162–167, 2006.

BRITO, M. E. F. et al. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in State of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 425–429, 2012.

BRITTA, E. A. et al. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 236, p. 1–12, 2014.

CALVETE, M. J. F.; GOMES, A. T. P. C.; MOURA, N. M. M. Clorinas em Terapia Fotodinâmica - Síntese e Aplicações. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 2, p. 92–103, 2009.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, H. Impact of leishmaniasis on public health. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 12, n. 4, p. 527–548, 2006.

CARREIRA, J. C. A.; MAGALHÃES, M. DE A. F. M.; SILVA, A. V. M. The Geospatial Approach on Eco-Epidemiological Studies of Leishmaniasis. In: **Leishmaniasis - Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment**. Rijeka: Intech Open Access, 2014.

CARVALHO, C. M. B. et al. Antimicrobial photodynamic activity of porphyrin derivatives: potential application on medical and water disinfection. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 13, p. 574–577, 2009.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 279–293, 2004.

DAI, T.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections—State of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 6, n. 3–4, p. 170–188, 2009.

DNDI, 2017. Drugs for Neglected Diseases Initiative. Disponível em: <<http://www.dndial.org/pt/doencas-negligenciadas>>. Acesso em 27 out. 2017.

DUTTA, S.; WAKI, K.; CHANG, K. P. Combinational sensitization of *Leishmania* with uroporphyrin and aluminum phthalocyanine synergistically enhances their photodynamic inactivation in vitro and in vivo. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 3, p. 620–625, 2012.

ENK, C. D. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with photodynamic therapy. **Archives of Dermatology**, v. 139, p. 432–434, 2003.

- ENK, C. D. et al. Cutaneous leishmaniasis responds to daylight-activated photodynamic therapy : proof of concept for a novel self-administered therapeutic modality. **British Journal of Dermatology**, v. 172, p. 1364–1370, 2015.
- ETHIRAJAN, M. et al. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. **Chemical Society Review**, v. 40, p. 340–62, 2011.
- EZZEDDINE, R. et al. Effect of molecular characteristics on cellular uptake, subcellular localization, and phototoxicity of Zn(2) N-Alkylpyridylporphyrins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 51, p. 36579–36588, 2013.
- FERNÁNDEZ, M. M.; MALCHIODI, E. L.; ALGRANATI, I. D. Differential effects of paromomycin on ribosomes of *Leishmania mexicana* and mammalian cells. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 86–93, 2011.
- FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. 1–7, 2011.
- FRÉZARD, F. et al. New insights into the chemical structure and composition of the pentavalent antimonial drugs, meglumine antimonate and sodium stibogluconate. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 102, p. 656–665, 2008.
- GARDLO, K. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 6, p. 893–6, 2003.
- GARDNER, D. M. et al. Association of acenaphthoporphyrins with liposomes for the photodynamic treatment of leishmaniasis. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, p. 645–652, 2010.
- GHAFFARIFAR, F. et al. Photodynamic therapy as a new treatment of cutaneous leishmaniasis. **La Revue de Santé de la Méditerranée orientale**, v. 12, n. 6, p. 902–908, 2006.
- GOULD, M. K. et al. Propidium iodide-based methods for monitoring drug action in the kinetoplastidae: Comparison with the Alamar Blue assay. **Analytical Biochemistry**, v. 382, n. 2, p. 87–93, 2008.
- GREKOV, I. et al. Calcium ionophore, calcimycin, kills *Leishmania* promastigotes by activating parasite nitric oxide synthase. **BioMed research international**, v. 2017, p. 1–6, 2017.
- HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, p. 67–73, 2016.
- IQBAL, H. et al. Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 6, n. 1, p. 1–5, 2016.
- JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. **Theranostics**, v. 2, n. 9, p. 916–966, 2012.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World leishmania infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, p. 579–593, 2015.
- KISHEN, A.; SHRESTHA, A.; COHENCA, N. Emerging Technologies in Root Canal Disinfection. In: **Disinfection of Root Canal Systems**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2014. p. 277–296.

KOU, J.; DOU, D.; YANG, L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 81591–81603, 2017.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Pthalocyanines**, v. 5, p. 105–129, 2001.

MILGROM, L. R. *The colours of Life: an Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*. Oxford, Oxford University Press, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2^a ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7^a ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8^a ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010a.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2^a ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010b.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of Leishmaniasis: Past , Present and Future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 1153–1169, 2007.

MOGHNIE, S. et al. Cationic amphiphilic Zn-porphyrin with high antifungal photodynamic potency. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 16, n. 11, p.1709–1719, 2017.

MONTOYA, A. et al. Development of a novel formulation with hypericin to treat cutaneous leishmaniasis based on photodynamic therapy in in vitro and in vivo studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5804–5813, 2015.

MOREIRA, L. M. et al. Phenotiazinium Dyes as photosensitizers (PS) in photodynamic therapy (PDT): spectroscopic properties and photochemical mechanisms. In: FARRUKH, M. A. **Advanced Aspects of Spectroscopy**. InTech, 2012. p. 393–422.

MOTA, L. A. A.; MIRANDA, R. R. Manifestações dermatológicas e otorrinolaringológicas na Leishmaniose. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, v. 15, n. 3, p. 376–381, 2011.

NEVES, D. P.; MELO, A. L. DE; VITOR, R. W. A. **Parasitologia Humana**. 11^a ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

O'CONNOR, A.E. GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 1053–1074, 2009.

ODEH, A. M. et al. Targeting mitochondria by Zn(II)NAlkylpyridylporphyrins: The impact of compound sub-mitochondrial partition on cell respiration and overall photodynamic efficacy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. e108238, 2014.

OLIVEIRA, K. T. DE et al. Basic concepts and applications of porphyrins, chlorins and phthalocyanines as photosensitizers in photonic therapies. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310–335, 2015.

OLLIARO, P. et al. Methodology of clinical trials aimed at assessing interventions for cutaneous

leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 3, p. 1–19, 2013.

PAVANI, C. et al. Effect of zinc insertion and hydrophobicity on the membrane interactions and PDT activity of porphyrin photosensitizers. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 8, p. 233–240, 2009.

PAVANI, C.; IAMAMOTO, Y.; BAPTISTA, M. S. Mechanism and efficiency of cell death of type II photosensitizers: Effect of zinc chelation. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, n. 4, p. 774–781, 2012.

PEIXOTO, I. N. **Otimização Experimental e Estudos da Distorção Não-Planar de N-Piridilporfirinas Precursoras de Moduladores Redox de Estresse Oxidativo**. João Pessoa, Universidade Federal da Paraíba, 2012.

PELLISSARI, D. M. et al. Tratamento da Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 20, n. 1, p. 107–110, 2011.

PELOI, L. S. et al. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis : The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 128, p. 353–356, 2011.

PINTO, J. G. et al. In vitro evaluation of photodynamic therapy using curcumin on *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. **Lasers in Medical Science**, v. 31, n. 5, p. 1–8, 2016.

PINTO, J. G. et al. Evaluation of methylene blue as photosensitizer in promastigotes of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 325–330, 2017.

PINTO, J. G.; SOARES, C. P.; MITTMANN, J. Assessment of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis* promastigote viability after photodynamic treatment with aluminum phthalocyanine tetrasulfonate (AlPcS4). **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, n. 3, p. 300–307, 2011.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550–555, 2003.

REIS, L. D. C. et al. Clinical, epidemiological and laboratory aspects of patients with American cutaneous leishmaniasis in the State of Pernambuco Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais de pacientes com leishmaniose cutânea americana no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 5, p. 439–443, 2008.

REY, L. **Bases da parasitologia médica**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2010.

ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, p. 1–8, 2009.

SANTOS, L. B. M. **Incorporação de zincoporfirina e azul de metileno em gel e avaliação para uso em terapia fotodinâmica**. Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

SBEGHEN, M. R. et al. Topical and intradermal efficacy of photodynamic therapy with methylene blue and light-emitting diode in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Journal of Lasers in Medical Sciences**, v. 6, n. 3, p. 106–111, 2015.

- SCARIOT, D. B. et al. Induction of early autophagic process on *Leishmania amazonensis* by synergistic effect of miltefosine and innovative semi-synthetic thiosemicarbazone. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. 255, p. 1–16, 2017.
- SILVA, E. P. D. O. et al. Photodynamic effects of zinc phthalocyanines on intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*. **Lasers in Medical Science**, v. 30, p. 347–354, 2015.
- SIQUEIRA, L. B. D. O. DE et al. Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for *Leishmania* spp. **Nanotechnology**, v. 28, n. 6, p. 1–20, 2017.
- SNOEK, E. M. VAN DER et al. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 22, p. 918–922, 2008.
- SOUKOS, N. S.; GOODSON, J. M. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. **Periodontology 2000**, v. 55, p. 143–166, 2011.
- SOUZA, D. M. et al. 5-ALA-mediated photodynamic therapy reduces the parasite load in mice infected with *Leishmania braziliensis*. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 3, 2017.
- SVANBERG, K. et al. Photodynamic therapy: superficial and interstitial illumination. **Journal of biomedical optics**, v. 15, n. 4, p. 41502, 2011.
- SWAVEY, S.; TRAN, M. Porphyrin and phthalocyanine photosensitizers as PDT Agents: a new modality for the treatment of melanoma. **Recent Advances in the Biology, Therapy and Management of Melanoma**, p. 253–282, 2013.
- TEIXEIRA, D. E. et al. **Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania**. 1^a ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 2013.
- THOMAS, M. et al. Amphiphilic cationic Zn-porphyrins with high photodynamic antimicrobial activity. **Future Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 709–724, 2015.
- TIM, M. Strategies to optimize photosensitizers for photodynamic inactivation of bacteria. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 150, p. 2–10, 2015.
- VIANA, O. et al. Comparative Study on the Efficiency of the Photodynamic Inactivation of *Candida albicans* Using CdTe Quantum Dots, Zn(II) Porphyrin and Their Conjugates as Photosensitizers. **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8893–8912, 2015.
- WAINWRIGHT, M. Dyes, flies, and sunny skies: photodynamic therapy and neglected tropical diseases. **Coloration Technology**, v. 133, p. 3–14, 2017.
- WALLER, R. F.; MCCONVILLE, M. J. Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 32, n. 12, p. 1435–1445, 2002.
- WANG, H. et al. The Phototoxicity of Xanthene Derivatives Against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Saccharomyces cerevisiae*. **Current Microbiology**, v. 52, p. 1–5, 2006.
- WHO. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/en/>>. Acesso em: 26 jan. 2016.
- YAGHINI, E.; SEIFALIAN, A. M.; MACROBERT, A. J. Quantum dots and their potential

biomedical applications in photosensitization for photodynamic therapy. **Nanomedicine**, v. 4, n. 3, p. 353–363, abr. 2009.

ANEXO – CERTIFICADO DE APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

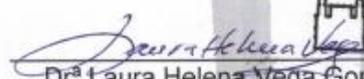
Certificamos que o projeto intitulado: **Análise *in vitro* e *in vivo* do potencial de novos compostos sobre tripanossomatídeos patogênicos.**

Protocolado sob nº 39/2012 pelo (a) pesquisador (a) Dra Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo. Está de acordo com a Lei 11.794/2008 e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/CPqAM) em 08/06/2013. Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 31/dezembro/2016.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie	Nº de Animais
Camundongos (<i>Mus musculus</i>) Albino Swiss machos	288
Camundongos (<i>Mus musculus</i>) BALB/c machos	1164
Coelhos Nova Zelândia machos	06

We certify that project entitled **Análise *in vitro* e *in vivo* do potencial de novos compostos sobre tripanossomatídeos patogênicos.** Protocol nº 39/2012, coordinated by Dra Regina Célia Bressan Queiroz de Figueiredo. Is according to the ethical principles in animal research adopted by the Brazilian law 11.794/2008 and so was approved by the Ethical Committee for Animal Research of the Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz on June, 08, 2013. In present version this project is licensed and valid until December, 31, 2016.

Recife (PE, Brazil) June, 10, 2013.


 Dra Laura Helena Vega Gonzales Gil
 Coordenadora CEUA/CPqAM

DRA. LAURA GIL
 Coordenadora da Comissão de
 Ética no Uso de Animais - CEUA
 Mat. SIAPE 01080027
 E-mail: laura@cpqam.fiocruz.br
 CPqAM / FIOCRUZ