UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCIÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TIAGO HENRIQUE DOS SANTOS SOUZA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO FOTODINÂMICO ASSOCIADO À ZINCOPORFIRINA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Recife - PE

2020

TIAGO HENRIQUE DOS SANTOS SOUZA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO FOTODINÂMICO ASSOCIADO À ZINCOPORFIRINA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Biotecnologia

Orientadora: Prof[a]. Dr[a]. Adriana Fontes

Co-orientadoras: Prof[a]. Dr[a]. Regina C. B. Q. Figueiredo

Dr[a]. Camila Galvão de Andrade

Recife - PE

2020

Catalogação na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Souza, Tiago Henrique dos Santos
Avaliação *in vitro* do efeito fotodinâmico associado à zincoporfirina para o tratamento da Leishmaniose cutânea / Tiago Henrique dos Santos Souza – 2020.

84 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Adriana Fontes
Coorientadoras: Regina C. B. Q. de Figueiredo e Camila Galvão de Andrade
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, 2020.
Inclui referências e anexo.

1. Leishmaniose 2. Fotossensibilizador 3. Terapia fotodinâmica I. Fontes, Adriana II. Figueiredo, Regina C. B. Q. de (orient.) III. Andrade, Camila Galvão de (coorient.) IV. Título.

616.9364 CDD (22.ed.) UFPE/CB – 2020-090

TIAGO HENRIQUE DOS SANTOS SOUZA

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO FOTODINÂMICO ASSOCIADO À ZINCOPORFIRINA PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 20/02/2020.

BANCA EXAMINADORA

_____

Profª. Dra. Adriana Fontes (Orientadora)
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE

_____

Prof. Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho (Titular Externo)
Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE

_____

Prof. Dr. Júlio Santos Rebouças (Titular Externo)
Departamento de Química – UFPB

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades e por ter iluminado e guiado meu caminho.

A minha orientadora, Prof[a]. Dr[a]. Adriana Fontes, pela oportunidade e por todo o suporte que me ofereceu, pelas correções e incentivos e por ter aceitado me acompanhar desde os primeiros passos nessa jornada científica e pelo exemplo que é para todos do grupo.

As minhas co-orientadoras Prof[a]. Dr[a]. Regina C. B. Q. Figueiredo e Dr[a]. Camila Galvão de Andrade, por todo o suporte recebido por elas, incentivo e disponibilidade para contribuir, pelo apoio e auxílio durante toda a pesquisa.

Aos professores Martha Ribeiro e Júlio Rebouças, pela colaboração e por terem me recebido em seus respectivos grupos de pesquisa e terem me fornecido meios para realização desta pesquisa.

Aos meus pais, Antônio Marcos e Ceça, aos meus tios, Dr. João e Moneide, por toda atenção, dedicação e compreensão. Pelo exemplo que são para mim e por sempre acreditarem nos meus sonhos. Minha namorada Larissa Macêdo por estar comigo todo o tempo me confortando e por todo o apoio e palavras de incentivo.

Aos amigos e colegas de trabalho M.ª Fernanda Cabral e Prof. Dr. Paulo Euzébio pelos ensinamentos e disposição de me auxiliar no decorrer da pesquisa. A todos os meus amigos do grupo de pesquisa NanoBio, que levarei para a vida, pela força, ajuda e amizade.

E também pelas amizades no laboratório de Biologia Celular de Patógenos, sou grato pelo suporte científico e por todo o auxílio recebido, especialmente Tuanne Melo, Lucas Lima e Abigail Miranda e a todos aqueles que porventura não foram mencionados aqui, mas que contribuíram de alguma maneira para esse trabalho, meus sinceros agradecimentos!

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, à Universidade Federal de Pernambuco, à FINEP e ao Instituo Aggeu Magalhães - FIOCRUZ-PE pelo suporte e a estrutura física necessária para a realização do trabalho. À FACEPE, CAPES e CNPq e pelo apoio financeiro.

A conquista é um acaso que talvez dependa mais das falhas dos vencidos do que do gênio do vencedor. (STAËL, 19-, n.p).

RESUMO

A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum de leishmaniose, uma doença parasitária infecciosa que pode ser causada por várias espécies, incluindo a *Leishmania amazonensis* e a *L. braziliensis*. A LC causa intensa segregação social com perdas socioeconômicas nas populações afetadas devido à gravidade das lesões provocadas. O tratamento da LC é baseado em fármacos que apresentam toxicidade e casos de resistência já foram reportados. A terapia fotodinâmica (TFD) surge então como uma alternativa promissora para o tratamento da LC. A TFD se baseia na ativação de fotossensibilizadores (FSs) pela luz, levando os parasitas à morte por estresse oxidativo. As zincoporfirinas (ZnPs) apresentam grande potencial como FSs para a TFD, pois se ligam fortemente às membranas e em sua maioria têm caráter hidrofílico. Assim, esse estudo objetivou investigar a ação *in vitro* da TFD mediada pela ZnTnHex-2-PyP^{4+} ou ZnP hexil, para o tratamento da LC. Para tanto, formas promastigotas foram incubadas com a ZnP hexil por 5 min nas concentrações de 0,62 e 1,25 μM e, então, irradiadas por um LED em 410 nm por 1 ou 3 min (irradiâncias de 38,2 ou 19,1 mW/cm^2 e exposições irradiantes de 2,3 e 3,4 J/cm^2, respectivamente). Após o tratamento fotodinâmico, as promastigotas foram avaliadas através de: (i) contagem pós-coloração com azul de tripan, (ii) citometria de fluxo – iodeto de propídeo (IP) e rodamina 123 (Rh 123) – e (ii) microscopias eletrônica de varredura (MEV) e fluorescência. Amastigotas foram submetidas à maior exposição irradiante. Foi também avaliada a citotoxicidade em macrófagos de camundongos BALB/c. O resultado da coloração com azul de tripan indicou que ambas concentrações de ZnP hexil foram capazes de inativar mais de 99% das promastigotas. A análise com IP corroborou os resultados com azul de tripan, comprovando o dano à membrana plasmática. O ensaio com Rh 123 indicou uma intensa despolarização e dano mitocondrial após a TFD. Foram encontrados resultados semelhantes para as promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis.* As imagens obtidas por MEV demonstram perda do formato fusiforme, rugosidade na membrana plasmática e diminuição do comprimento do corpo celular. A microscopia de fluorescência revelou uma marcação intracelular, em forma de agregados, pela ZnP hexil, ao longo do corpo do parasita. A redução do número de amastigotas de *L. amazonensis* no interior dos macrófagos foi maior que 50% para ambas as concentrações após uma sessão de tratamento fotodinâmico. O tratamento descrito não apresentou toxicidade frente às células de mamífero. Dessa forma, esses resultados indicam que o protocolo fotodinâmico estabelecido, utilizando a ZnP hexil, tem potencial para ser avaliado *in vivo* e pode ser uma alternativa para o tratamento da LC.

Palavras-chave: Fotossensibilizador. ZnTnHex-2-PyP^{4+}. Terapia Fotodinâmica. *Leishmania amazonensis*.

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common form of leishmaniasis, an infectious parasitic disease that can be caused by several species, including *Leishmania amazonensis* and *L. braziliensis*. CL causes intense social segregation with socioeconomic losses in the affected populations due to the severity of the lesions caused. The treatment of CL is based on drugs that are toxic and cases of resistance have already been reporting. Then, photodynamic therapy (PDT) arises as a promising alternative for the treatment of CL. The PDT is based on the activation of photosensitizers (PSs) by light, leading the parasites to death by oxidative stress. Zinc porphyrins (ZnPs) have great potential as PSs for PDT. ZnPs can bind strongly to membranes and most of them have a hydrophilic character. Thus, this study aimed to investigate the *in vitro* action of PDT mediated by ZnTnHex-2-PyP^{4+} or ZnP hexyl, for the treatment of CL. For this purpose, promastigotes were incubated with ZnP hexyl for 5 min at concentrations of 0.62 and 1.25 μM and then irradiated by an LED at 410 nm for 1 or 3 min (irradiance of 38.2 or 19.1 mW/cm^2 and irradiance exposures of 2.3 or 3.4 J/cm^2, respectively). After the photodynamic treatment, the promastigotes were evaluated using: (i) count after staining with trypan blue, (ii) flow cytometry - propidium iodide (PI) and rhodamine 123 (Rh 123) - and (ii) electron scanning (SEM) and fluorescence microscopies. Amastigotes were subject to the highest irradiance exposure. The cytotoxicity in macrophages of BALB/c mice was also evaluated. The results of the trypan blue staining indicated that both concentrations of ZnP hexyl were able to inactivate more than 99% of the promastigotes. The PI analysis corroborated the results with trypan blue, indicating the damage on the plasma membrane. The Rh 123 assay showed intense depolarization and mitochondrial damage after PDT. Similar results were found for *L. amazonensis* and *L. braziliensis* promastigotes. The images obtained by SEM demonstrate loss of the fusiform shape, roughness on the plasma membrane, and a decrease in the length of the cell's body. Fluorescence microscopy revealed intracellular labeling, organized in clusters, by ZnP hexyl, along the parasite's body. The reduction of the number of *L. amazonensis* amastigotes inside the macrophages was greater than 50% for both concentrations after one session of photodynamic treatment. The described treatment showed no toxicity to mammalian cells. Thus, these results indicate that the photodynamic protocol established, using ZnP hexyl, has the potential to be evaluated *in vivo* and can be an alternative for the treatment of CL.

Keywords: Photosensitizer. ZnTnHex-2-PyP^{4+}. Photodynamic Therapy. *Leishmania amazonensis*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1 –	Lesões típicas da leishmaniose: (A) Leishmaniose cutânea localizada. (B) Leishmaniose cutânea difusa.	21
Figura 2 –	Taxonomia geral do gênero *Leishmania*.	22
Figura 3 –	Mapa de casos reportados da leishmaniose cutânea referente ao ano de 2018.	23
Figura 4 –	Incidência da leishmaniose cutânea no Brasil referente ao ano de 2016.	24
Figura 5 –	Representação das formas adaptativas da *Leishmania*, forma amastigota, promastigota procíclica e promastigota metacíclica, respectivamente.	25
Figura 6 –	Representação do ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania* no inseto vetor e no hospedeiro mamífero.	26
Figura 7 –	Linha do tempo relacionada ao desenvolvimento da TFD ao longo da história.	29
Figura 8 –	Mecanismo geral da terapia fotodinâmica na geração de espécies reativas de oxigênio mediado pela luz. **FS** – fotossensibilizador.	30
Figura 9 –	Comparação entre o tempo de vida, a reatividade e a distância de difusão entre os EROs.	31
Figura 10 –	Estrutura geral do núcleo porfirínico e seus derivados, clorinas e bacterioclorinas.	35
Figura 11 –	Representação esquemática da versatilidade das porfirinas aplicadas em diversas áreas do conhecimento.	37
Figura 12 –	Estrutura da Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-n-hexilpiridinio-2-il)porfirina.	38
Figura 13 –	Mecanismo dominante de morte celular de acordo com a localização subcelular do FS nas diferentes organelas.	39
Figura 14 –	Espectros de absorção (preto) e de emissão (vermelho) da ZnTnHex-2-PyP^{4+} 5 μM, diluída em tampão fosfato-salino. Excitação em 426 nm.	40

MANUSCRITO A SER TRADUZIDO E SUBMETIDO PARA A REVISTA JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY

Figura 1 – Sobrevivência de promastigotas de *L. amazonensis* determinada pela contagem celular por azul de tripan, imediatamente após a exposição ao efeito fotodinâmico associado à ZnP. **Legenda: Luz 1 -** Irradiância 19,1 mW/cm^2 por 3 min (3,4 J/cm^2)**; Luz 2 -** Irradiância 38,2 mW/cm² por 1 min (2,4 J/cm^2); **ZnP -** ZnP 1,25 μM; **TFD 1 -** ZnP 0,62 μM + Luz 1; **TFD 2 -** ZnP 0,62 μM + Luz 2; **TFD 3 -** ZnP 1,25 μM + Luz 1; **TFD 4 -** ZnP 1,25 μM + Luz 2. *Grupos estatisticamente significantes (p <0,05) quando comparados ao controle. 60

Figura 2 – Histogramas para promastigotas de *L. amazonensis* após tratamento fotodinâmico associado à ZnP hexil, indicando marcação com IP. M1 - células não marcadas; M2 - células marcadas. **Legenda**: **A -** IP (controle negativo – sem tratamento); **B -** H_2O_2 (controle positivo); **C -** ZnP 1,25 μM; **D -** Luz 1 (3,4 J/cm^2); **E -** Luz 2 (2,4 J/cm^2); **F -** ZnP 0,62 μM + Luz 1 (**TFD 1**); **G -** ZnP 0,62 μM + Luz 2 (**TFD 2**); **H -** ZnP 1,25 μM + Luz 1 (**TFD 3**); **I -** ZnP 1,25 μM + Luz 2 (**TFD 4**). 62

Figura 3 – Avaliação por citometria de fluxo de alterações no potencial mitocondrial em promastigotas de *L. amazonensis*, submetidas ao efeito fotodinâmico associado à ZnP hexil. **Legenda: A -** MIF da Rh 123; **B -** Índice de variação. **ZnP -** 1,25 μM; **Luz 1** (3,4 J/cm^2); **Luz 2** (2,4 J/cm^2); **TFD 1 -** ZnP 0,62 μM + Luz 1; **TFD 2 -** ZnP 0,62 μM + Luz 2; **TFD 3 -** ZnP 1,25 μM + Luz 1; **TFD 4 -** ZnP 1,25 μM + Luz 2. 63

Figura 4 – Imagem de microscopia de fluorescência confocal de promastigotas de *L. amazonensis*. **A -** Marcação pela ZnP hexil (5μM) da *L. amazonensis* após incubação por 15 min (em vermelho). **B -** Os parâmetros foram acentuados para relevar a autofluorescência da célula em cinza. Observa-se um padrão predominantemente em forma de agregados (setas) pela ZnP hexil 66

ao longo do citoplasma do parasita. Barra de escala: 10 μm.

Figura 5 – Efeito fotodinâmico sobre a ultraestrutura de promastigotas de *L. amazonensis* observado através da microscopia eletrônica de varredura. **Legenda: A -** Controle (sem tratamento); **B -** Luz 1 (3,4 J/cm^2); **C -** ZnP hexil 1,25 μM; **D -** ZnP 1,25 μM + Luz 1 (TFD 1); **E -** ZnP 0,62 μM + Luz 1 (TFD 3). Seta branca indica ruptura do flagelo celular e seta vermelha um destacamento da membrana flagelar. Barra de escala 5 μm. 67

Figura 6 – Viabilidade celular de macrófagos medulares, avaliada imediatamente após tratamento fotodinâmico associado à ZnP hexil. **Legenda**: **ZnP -** 1,25 μM; **Luz 1 -** 3,4 J/cm^2; **TFD 1 -** ZnP 0,62 μM + Luz 1; **TFD 3 -** ZnP 1,25 μM + Luz 1. Observações: grupos estatisticamente significantes (p <0,05) quando comparados ao controle (**) e ao tratamento só com luz (*). 68

Figura 7 – Porcentagem total de amastigotas de *L. amazonensis* por macrófagos imediatamente após o tratamento fotodinâmico associado a ZnP hexil. **Legenda: Luz 1 -** 3,4 J/cm^2; **TFD 1 -** ZnP 0,62 μM + Luz 1; **TFD 3 -** ZnP 1,25 μM + Luz 1. Observações: grupos estatisticamente significantes (p <0,05) quando comparados ao controle (*). 70

Figura 8 – Imagens de microscopia óptica de macrófagos corados por coloração panótica. **A -** Macrófagos infectados não tratados. **B -** Macrófagos infectados, após o tratamento fotodinâmico (TFD 1 - ZnP 0,62 μM + Luz 1). Barra de escala: 10 μm. 70

Figura S1 – Sobrevivência de promastigotas de *L. braziliensis* determinada pela contagem celular por azul de tripan, imediatamente após a exposição ao efeito fotodinâmico associado à ZnP. Legenda: **Luz 1 -** Exposição irradiante de *ca.* 3,4 J/cm^2; **Luz 2 -** Exposição irradiante de *ca.* 2,4 J/cm^2; **ZnP -** ZnP 1,25 μM; **TFD 3 -** ZnP 1,25 μM + Luz 1; **TFD 4 -** ZnP 1,25 μM + Luz 2. *Grupos estatisticamente significantes (p <0,05) quando comparados ao controle. 79

Figura S2 – Histogramas para promastigotas de *L. braziliensis* após tratamento 79

fotodinâmico associado à ZnP hexil, indicando marcação com IP. **M1 -** células não marcadas; **M2 -** células marcadas. **Legenda**: **A -** IP (controle negativo – sem tratamento); **B -** H_2O_2 (controle positivo); **C -** ZnP 1,25 μM; **D -** Luz 1 (3,4 J/cm^2); **E -** ZnP 0,625 μM + Luz 1 (**TFD 1**); **F -** ZnP 1,25 μM + Luz 1 (**TFD 3**).

Figura S3 – Avaliação por citometria de fluxo de alterações no potencial mitocondrial em promastigotas de *L. braziliensis*, submetidas ao efeito fotodinâmico associado a ZnP hexil. **Legenda**: **A -** MIF da Rh 123; **B -** Índice de variação. **ZnP -** 1,25 μM; **Luz 1 -** 3,4 J/cm^2; **TFD 1 -** ZnP 0,62 μM + Luz 1; **TFD 3 -** ZnP 1,25 μM + Luz 1. 80

LISTA DE TABELAS DA REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Tabela 1 – Características de um fotossensibilizador modelo. 32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA	Ácido Aminolevulínico
AM	Azul de metileno
CEUA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CN	Mediana de fluorescência dos parasitos do grupo controle
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
Cu^{2+}, Cu(II)	Íon cúprico ou íon cobre(II)
e^-	Elétrons
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FC	Ftalocianinas
FDA	*Food and Drug Administration*
Fe^{3+}, Fe(II)	Íon férrico ou íon ferro(III)
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FS	Fotossensibilizador
^1FS	Singleto Fundamental
$^1FS^*$	Singleto Excitado
$^3FS^*$	Tripleto Excitado
H_2O_2	Peróxido de Hidrogênio
Hp	Hematoporfirina
IP	Iodeto de Propídeo
IPEN	Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
IV	Índice de variação
LC	Leishmaniose Cutânea
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LED	*Light Emitting Diodes* - Diodo Emissor de Luz
LM	Leishmaniose Mucocutânea
LV	Leishmaniose Visceral
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MF	Mediana de fluorescência para parasitas tratados
MTT	Brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazolium azul
Ni^{2+}, Ni(II)	Íon níquel(II)

O_2	Oxigênio Molecular
$O_2^{\bullet -}$	Ânion Superóxido
$^1O_2$	Oxigênio Singleto
$OH^{\bullet}$	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
Pp IX	Protoporfirina IX
Rh 123	Rodamina 123
SFB	Soro Fetal Bovino
TFD	Terapia Fotodinâmica
URO	Uroporfirina Citosólica I
Zn^{2+}, Zn(II)	Íon zinco(II)
ZnTE-2-PyP^{4+}	Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-etilpiridinio-2-il)porfirina
ZnTnHex-2-PyP^{4+}	Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-n-hexilpiridinio-2-il)porfirina
5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico
δ-ALA	Ácido delta-aminolevulínico
$\Delta\psi m$	Potencial de membrana mitocondrial

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 OBJETIVOS 19
2.1 Geral 19
2.2 Específicos 19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 20
3.1 A leishmaniose cutânea e suas formas clínicas 20
3.1.1 Transmissão 21
3.1.2 Diagnóstico 21
3.2 Classificação 22
3.3 Epidemiologia 23
3.4 Ciclo biológico 25
3.5 Tratamento atual 27
3.6 Terapia Fotodinâmica 28
3.7 Fotossensibilizadores 32
3.7.1 Porfirinas 35
3.7.2 Zinco porfirinas (ZnPs) 37
3.8 Terapia fotodinâmica no tratamento da leishmaniose cutânea 41
4 REFERÊNCIAS 45
5 MANUSCRITO A SER TRADUZIDO E SUBMETIDO PARA A REVISTA JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY 53
6 CONCLUSÃO 81
7 PERSPECTIVAS 82
ANEXO A- CARTAS DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA 83

1 - INTRODUÇÃO

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma das doenças parasitárias mais comuns no mundo, sendo um problema mundial de saúde pública, além de ser considerada uma doença negligenciada devido à falta de investimentos em novas formas terapêuticas. De acordo com a OMS, são mais de 12 milhões de pessoas infectadas, distribuídas em 88 países. Dentre eles, o Brasil se encontra como um dos mais endêmicos. A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum da doença. A incidência anual mundial é de 0,6 a 1,0 milhões de novos casos de LC (OMS, 2017).

A leishmaniose é transmitida por insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos. 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). A LC é uma manifestação dérmica caracterizada pela presença de lesões cutâneas, que constituem úlceras rasas, circulares, com bordas elevadas e bem definidas e com a superfície em aspecto granular, causando desconforto e dor ao portador, tanto no âmbito físico, quanto no campo psicossocial (IQBAL et al., 2016).

Atualmente, as drogas de escolha para o tratamento são os antimoniais pentavalentes, enquanto a anfotericina B e a pentamidina representam a terapia de segunda linha. No entanto, a toxicidade, o surgimento de resistência do parasita, o alto custo, o longo regime de tratamento e o modo de administração limitam o uso desses compostos (SANTOS et al., 2018). A junção destes fatores reforça a necessidade do desenvolvimento de novas opções terapêuticas mais eficazes. Surge então a terapia fotodinâmica (TFD) 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 (SIQUEIRA et al., 2017).

As vantagens da TFD podem incluir um resultado estético superior à terapia padrão e a ausência de desenvolvimento de resistência. Além disso, a técnica pode ser aplicada localmente, de forma minimamente invasiva e com um período de tratamento inferior em relação aos medicamentos convencionais. A TFD é baseada na utilização de substâncias com propriedades fotossensibilizadoras e na ativação destas pela luz, na presença de oxigênio. Após a irradiação, a ativação do fotossensibilizador (FS) resulta na geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), que são tóxicas para a célula e levam a sua morte por estresse oxidativo (GOTO; LINDOSO, 2010; SIQUEIRA et al,. 2017). A ausência da atividade da

catalase e glutationa peroxidase nas espécies do gênero *Leishmania* as tornam mais susceptíveis ao dano oxidativo induzido pela TFD do que as células de mamíferos (ENK et al., 2003).

Estudos vêm indicando a eficiência da TFD ao longo do tempo. Há casos relatados na literatura que envolvem o tratamento de pacientes com LC por TFD, em sua maioria relacionados a espécies características do Velho Mundo (Europa, Ásia e África), como a *L. major* e a *L. aethiopica*. Recentemente, Johansen, Jemec e Fabricius (2019), relataram o caso de um menino de 15 anos com LC, causada por *L. major*, multirresistente a várias terapias convencionais. Então, foi aplicada a TFD duas vezes semanalmente durante 12 semanas utilizando o ácido aminolevulínico (ALA) como FS, resultando na cura e cicatrização completa da lesão. No entanto, alguns estudos relatam, por exemplo, que a eficiência do ALA seria uma consequência de uma destruição tecidual inespecífica (KOSAKA et al., 2007; AKILOV et al., 2017).

Resultados como esses vêm estimulando a aplicação da TFD sobre outras espécies, como as características do Novo Mundo (continente americano), como a *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, endêmicas no Brasil (CHAKRAVARTY et al., 2019). Esses estudos também indicam que ainda é importante protocolos para a TFD melhor padronizados e seus efeitos sobre microrganismos sejam melhor compreendidos (ASILAN; DAVAMI, 2006; SABINO et al., 2019). A literatura apresenta parâmetros distintos relacionados à TFD, tais como o tipo de FS, concentração utilizada, tempo de aplicação e incubação e irradiância. Adicionalmente, ainda é indiscutível a relevância da procura por novos FSs que possam ser utilizados eficientemente em mínimas concentrações, com menores tempos de incubação e parâmetros de irradiação, de modo até a diminuir a fototoxicidade em tecidos adjacentes (MARTINO et al., 2017). Assim, as porfirinas e seus derivados apresentam-se como promissores FSs na aplicação da TFD para o tratamento da LC, devido a suas propriedades fotofísicas singulares e versatilidade estrutural, que pode modular seu alvo de ação, seu caráter lipofílico e iônico (BASTOS et al., 2012). As porfirinas e seus derivados têm sido usados também com sucesso como FSs em TFD antimicrobiana, sendo descrita a sua atividade fotodinâmica para inibição de *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, por exemplo (THOMAS et al., 2015; VIANA et al., 2015; SAH et al., 2019).

Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando e já apresentou bons resultados na inativação fotodinâmica de formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* utilizando a

Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-etilpiridinio-2-il)porfirina (ZnTE-2-PyP^{4+}, ZnP etil). Essa porfirina é um FS que, de acordo com estudos em células de mamíferos, tende a se acumular preferencialmente nos lisossomos e/ou apresenta-se distribuída de forma difusa no citoplasma (BENOV; CRAIK; BATINIC-HABERLE, 2011; ANDRADE et al., 2018). Por outro lado, o derivado hexil utilizado no presente trabalho, Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-n-hexilpiridinio-2-il)porfirina (ZnTnHex-2-PyP^{4+}, ZnP hexil), pode ser potencialmente ainda mais eficaz que a ZnP etil, devido a sua maior lipofilicidade, o que pode levar a uma maior biodisponibilidade desse FS pelas células. Além disso, sua ação biológica vem sendo associada a danos em alvos celulares essenciais como a mitocôndria, em células de mamíferos (EZZEDDINE et al., 2013; ODEH et al., 2014).

Assim, devido aos efeitos colaterais relacionados com a terapia atual para leishmaniose e a busca por tratamentos fotodinâmicos mais rápidos e efetivos utilizando parâmetros de irradiação e concentrações de FS menores o presente estudo objetivou avaliar a ação *in vitro* da ZnP hexil na inativação de parasitas causadores da LC no Novo Mundo.

2 - OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar *in vitro* o efeito fotodinâmico utilizando a ZnTnHex-2-PyP^{4+} como um fotossensibilizador alternativo para o tratamento da leishmaniose cutânea.

2.2 Específicos

- Estabelecer parâmetros de inativação fotodinâmica associada a ZnTnHex-2-PyP^{4+} sobre as formas promastigotas;
- Determinar os fotodanos mediados pela ZnTnHex-2-PyP^{4+} sobre as formas promastigotas;
- Avaliar a ação fotodinâmica na inativação de formas amastigotas;
- Avaliar o efeito citotóxico da ZnTnHex-2-PyP^{4+} associada ou não à luz sobre células de mamíferos.

3 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A leishmaniose cutânea e suas formas clínicas

A leishmaniose é uma doença infecto-parasitária que acomete o homem, causada por parasitas intracelulares do gênero *Leishmania*. A apresentação clínica depende de uma interação complexa entre a resposta imune mediada por células hospedeiras, e as espécies do protozoário e do vetor. Apresenta quatro formas clínicas: (1) leishmaniose cutânea (LC), (2) LC difusa (LCD), (3) leishmaniose mucocutânea (LM) e (4) leishmaniose visceral (LV) (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

A LC é a forma mais comum da doença, pode ser causada por mais de 20 espécies, e no Brasil, aproximadamente 35.000 novos casos são notificados por ano (GOSCH et al., 2017). É definida como uma manifestação dérmica caracterizada pela presença de uma ou mais pequenas pápulas vermelhas que apresentam bordas infiltradas e eritematosas que se tornam mais escuras e se transformam em úlceras com bordas elevadas após algumas semanas. Essas lesões se localizam principalmente nas regiões mais expostas do corpo como cabeça, mãos e braços, causando muita dor e desconforto ao portador, tanto fisicamente quanto socialmente (**Figura 1**) (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; IQBAL et al., 2016).

É possível ainda ocorrer a disseminação dessa forma clínica em algumas situações em que os macrófagos infectados transportam o parasito para outras partes do corpo, podendo se estabelecer lesões secundárias, levando ao desenvolvimento da LCD, na qual são observadas lesões múltiplas e crônicas. No Novo Mundo, as espécies mais predominantes causadoras da LC são *L. mexicana*, *L. braziliensis* ou *L. panamensis*, enquanto no Velho Mundo são *L. major* ou *L. tropica* (DAVID; CRAFT, 2009). As espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis* são os principais agentes etiológicos no Brasil. A LM pode ser causada pelas espécies *L. braziliensis* e *L. panamensis*. Já a LCD, uma forma severa da LC, pode ser causada por *L. aethiopica* no Velho Mundo e *L. mexicana* e *L. amazonensis* no Novo Mundo. Estes parasitas podem causar formas clínicas localizadas ou difusas da doença (SILVA et al., 2015; CHAKRAVARTY et al., 2019).

Figura 1: Lesões típicas da leishmaniose: (A) Leishmaniose cutânea localizada. (B) Leishmaniose cutânea difusa.

Fonte: TEIXEIRA et al., 2013.

3.1.1 Transmissão

Os vetores das leishmanioses são insetos hematófagos pertencentes à Ordem Díptera, Família Psychodidae, Subfamília Phlebotominae do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo. No Brasil, *Lutzomyia longipalpis* é o principal vetor da LC, encontrado não apenas em florestas e matas, mas também em ambientes urbanos, principalmente em áreas com alguma vegetação. A possibilidade de um flebotomíneo ser efetivo como vetor relaciona-se a interações complexas entre os parasitos da *Leishmania* e os insetos vetores, as quais são altamente específicas, possibilitando a multiplicação e diferenciação do parasita dentro do tubo digestivo do inseto (KAMHAWI, 2006; VIANNA et al., 2016).

3.1.2 Diagnóstico

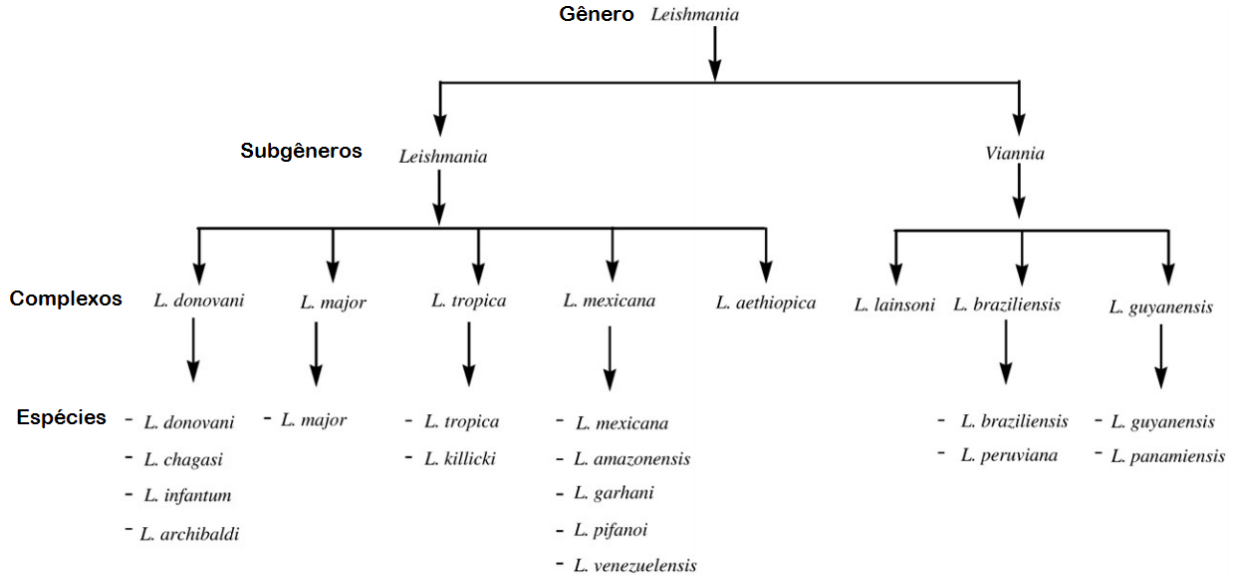
Os métodos de diagnósticos da LC são baseados na avaliação de aspectos clínicos, análise histológica/citológica das lesões (biópsia) e abrangem também os aspectos epidemiológicos ou isolamento em cultura. O diagnóstico positivo se dá pela identificação do parasito ou de seus produtos (anticorpos ou antígenos), nos fluídos ou tecidos biológicos do hospedeiro. Além da confirmação do diagnóstico, estes achados podem fornecer importantes informações epidemiológicas, através da espécie identificada, auxiliando o tratamento e as medidas de controle. Outros testes utilizados são de biologia molecular (Reação em Cadeia da Polimerase - PCR), testes intradérmicos e sorológicos como, ELISA e imunofluorescência direta (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010; STOCKDALE; NEWTON, 2013).

3.2 Classificação

De acordo com a taxonomia, o gênero *Leishmania* faz parte do Reino Protozoa, Filo *Sarcomastigophora*, Subfilo *Mastigophora*, Classe *Zoomastigophora*, Ordem *Kinetoplastida*, Subordem *Trypanosomatina*, Família *Trypanosomatidae*. Este gênero engloba espécies que podem ser subdivididas em dois subgêneros: *L. (Viannia)* e *L. (Leishmania),* as quais diferem principalmente no sítio de desenvolvimento do parasito no trato digestivo dos insetos vetores. Esta doença é também frequentemente classificada de acordo com as regiões do mundo em que ocorre. No hemisfério oriental ela é endêmica na Ásia, na África e no sul da Europa e é chamada de leishmaniose do Velho Mundo. No hemisfério ocidental, estende-se do centro-sul do Texas às Américas Central e do Sul e é chamada de leishmania do Novo Mundo (MISHRA et al., 2009; AKHOUNDI et al., 2016).

São conhecidas 31 espécies parasitas de mamíferos e aproximadamente 20 espécies são patogênicas para seres humanos (**Figura 2**). No Brasil, são identificadas sete espécies de leishmanias patogênicas para seres humanos, sendo as principais: *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, contando também com a presença das espécies *L.(V.) lainsoni*, *L.(V.) naiffi*, *L.(V.) lindenberg* e *L.(V.) shawi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; LAINSON, 2010; AKHOUNDI et al., 2016).

Figura 2: Taxonomia geral do gênero *Leishmania*

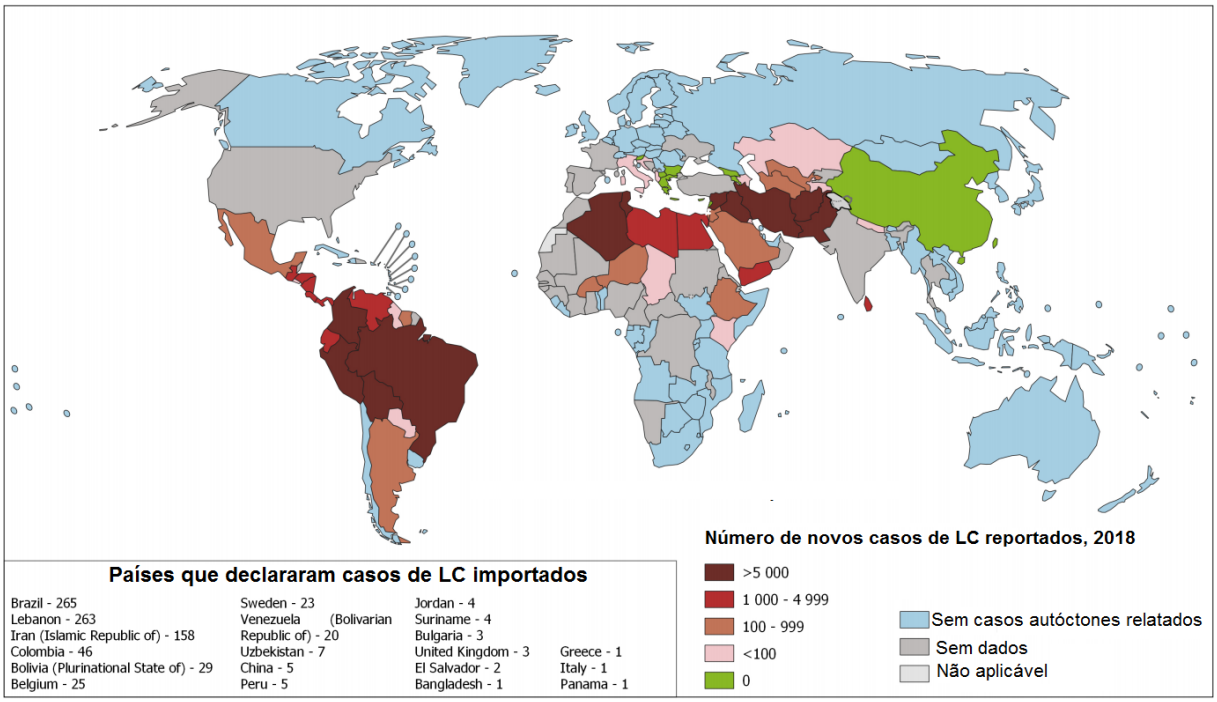


Fonte: Adaptado de MISHRA et al., 2009.

3.3 Epidemiologia

A leishmaniose é considerada uma das doenças parasitárias mais comuns no mundo, são 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco, características de países subdesenvolvidos. É considerada uma doença negligenciada devido à falta de investimentos em terapêuticas e inovações. A maioria dos casos da LC (cerca de 70%) ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil e Colômbia, assim como ilustra a **Figura 3** (OMS, 2017).

Figura 3: Mapa de casos reportados da leishmaniose cutânea referente ao ano de 2018.



Fonte: Adaptado de WHO, 2018.

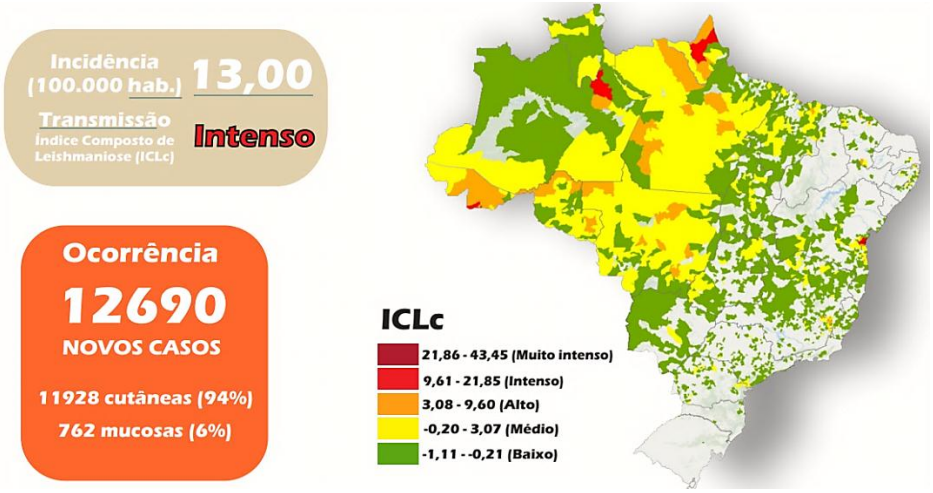
Ainda de acordo com a OMS, em 2016, foi lançado um estudo no qual foram selecionados os países que apresentam alta prevalência da doença. Dos 25 países selecionados para o estudo, 13 têm uma alta prevalência de LV (Bangladesh, China, Etiópia, Geórgia, Índia, Quênia, Nepal, Paraguai, Somália, Sudão do Sul, Espanha, Sudão, e Uganda), 11 têm uma alta carga de LC (Afeganistão, Argélia, Colômbia, Irã, Marrocos, Paquistão, Peru, Arábia Saudita, República Árabe da Síria, Tunísia e Turquia), e 1 (Brasil) tem uma alta carga parasitária de ambas as formas clínicas (OMS, 2017; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A LC, que é a forma mais comum da doença, enquadra-se entre as seis doenças infecciosas mais importantes da atualidade, devido à alta incidência e também pelas alterações dermatológicas, as quais causam lesões ulcerativas que favorecem o crescimento de bactérias

oportunistas, o que acarreta em infecções secundárias. A incidência anual mundial é de 0,6 a 1,0 milhões de novos casos de LC. porém pode existir um número de acometidos bem maior, uma vez que muitos casos não são oficialmente declarados, pois a notificação não é obrigatória em muitos países endêmicos (NEVES; MELO; VITOR, 2005; BRITO et al., 2012 OMS, 2017).

Em 2017, 20.792 dos 22.145 (94%) casos notificados à OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Quase 90% dos casos de LV ocorrem no Estado Plurinacional da Bolívia, Brasil e Peru (**Figura 4**). Já no Brasil, no período entre 2007 e 2017, 235.301 casos de LC foram diagnosticados pelo sistema nacional de saúde e muitos deles foram relatados no estado de Pernambuco. Esses casos ocorrem, em sua maioria, na faixa etária de 20-39 anos, e em relação ao gênero, aproximadamente 70% destes foram encontrados no sexo masculino (OMS, 2017; SINAN et al., 2019).

Figura 4: Incidência da leishmaniose cutânea no Brasil referente ao ano de 2016.



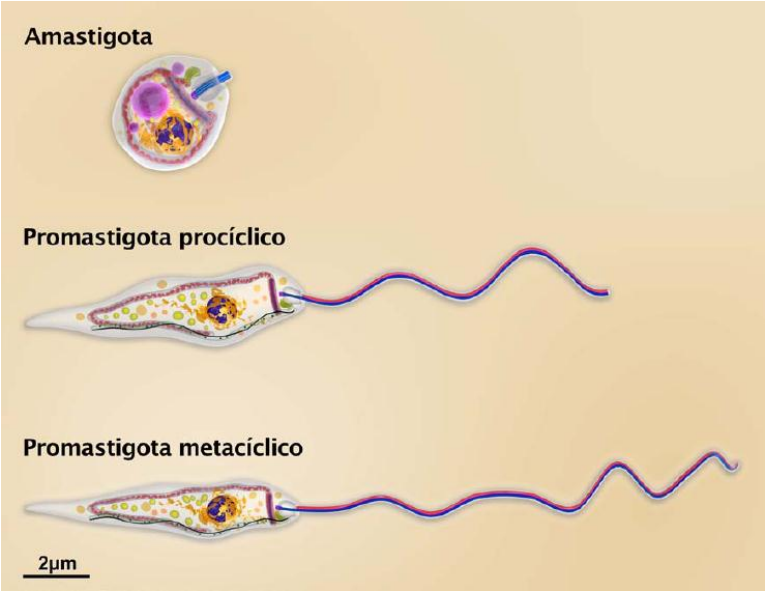
Fonte: WHO, 2018.

Em Pernambuco, os primeiros casos de LC relatados são da década de 1930. De 2001 a 2010, foram registrados 4.855 casos de LC em Pernambuco, com uma média de 485 casos por ano. De fato, a LC é endêmica em todas as regiões geográficas de Pernambuco e os surtos são esporadicamente detectados nas regiões do Agreste e Mata Atlântica, em alguns municípios a taxa de ocorrência é de 54,7 casos por 100.000 habitantes (BRITO et al., 2012; SINAN et al., 2019).

3.4 Ciclo biológico

Os protozoários causadores da leishmaniose são parasitas unicelulares, e apresentam um ciclo de vida heteroxênico, ou seja, se desenvolvem em dois hospedeiros distintos, invertebrados e vertebrados (flebotomíneos e mamíferos). Ademais, esses protozoários apresentam-se sob duas formas distintas durante o seu ciclo de vida: promastigotas extracelulares e flageladas que proliferam no tubo digestivo da fêmea do flebotomíneo, enquanto amastigotas são formas intracelulares adaptadas para viver dentro dos fagolisossomos, principalmente de macrófagos. A forma promastigota mede 5 - 20 μm em comprimento e 1 - 4 μm em largura, já as amastigotas medem em média 2 - 4 μm de diâmetro (**Figura 5**) (TSIGANKOV, et al., 2014; JARA, et al., 2017).

Figura 5: Representação das formas adaptativas da *Leishmania*, forma amastigota, promastigota procíclica e promastigota metacíclica, respectivamente.

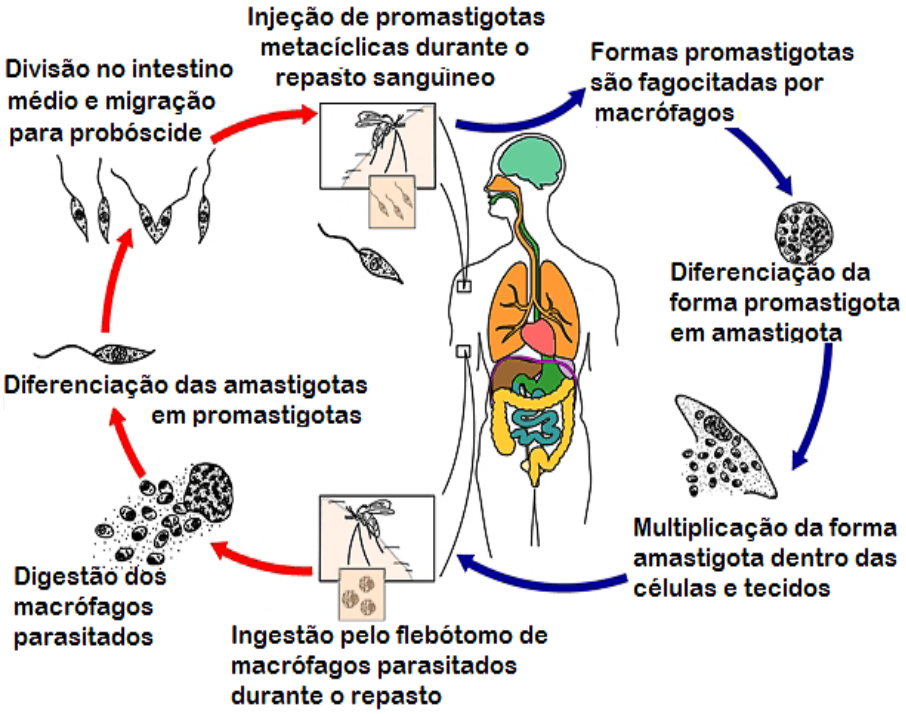


Fonte: TEIXEIRA et al., 2013.

O ciclo pode iniciar durante o repasto sanguíneo, quando as fêmeas dos insetos vetores infectantes inoculam, junto com a saliva, formas promastigotas metacíclicas, por meio do seu aparelho bucal, curto e rígido, adequado para romper o tecido e vasos sanguíneos do hospedeiro. Uma vez inoculadas, as formas promastigotas são reconhecidas e fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, sendo internalizadas em vacúolos parasitóforos. Posteriormente ocorre a fusão com lisossomos, onde através de alterações de pH, temperatura e ação das enzimas, as formas promastigotas transformam-se em amastigotas (KAYE; SCOTT, 2011; TEIXEIRA et al., 2013).

Já os flebotomíneos se infectam também durante o repasto sanguíneo, no hospedeiro vertebrado infectado, à medida que ingerem macrófagos parasitados e/ou as formas amastigotas livres no sangue ou na linfa. A saliva do inseto possui vários compostos biológicos ativos, como vasodilatador, antiagregante plaquetário e anticoagulante, o que facilita o fluxo sanguíneo e o acúmulo linfático, também possui ação quimiotática para monócitos aumentando sua infectividade (**Figura 6**) (MICHALICK e RIBEIRO, 2011).

Figura 6: Representação do ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania* no inseto vetor e no hospedeiro mamífero.



Fonte: Adaptado de http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html.

No tubo digestivo do flebotomíneo, ocorre o rompimento da membrana dos macrófagos e a liberação das formas amastigotas. Na região anterior do tubo digestivo, ocorre o desenvolvimento das formas amastigotas, as quais se tornam alongadas e apresentam flagelo evidente, transformando-se na forma promastigota procíclica, as quais se aderem pelo flagelo e se multiplicam por divisão binária longitudinal. Após esta multiplicação, ocorre a migração das formas promastigotas procíclicas até a válvula estomodeal, próximo a probóscide (canal alimentar do inseto), onde ocorre um processo denominado metaciclogênese, no qual estas formas deixam de se reproduzir e tornam-se altamente móveis e infectantes (promastigotas metacíclicas). Devido a este processo, algumas modificações ocorrem na superfície do parasito, como por exemplo, a perda da adesão ao epitélio, isso faz com o que as

promastigotas metacíclicas destaquem-se e migrem para a probóscide. Portanto, durante o próximo repasto sanguíneo as formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas pelo inseto vetor na área da lesão e recomeça o ciclo (TEIXEIRA et al., 2013; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

3.5 Tratamento atual

Como mencionado anteriormente, a leishmaniose é uma doença negligenciada, característica de países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Alguns fatores como a pobreza, ocupação urbana não planejada, péssimas condições de saneamento e precariedade são catalisadores de sua ocorrência, o que também reflete em sua forma de tratamento (OMS, 2017).

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento são os derivados dos antimonias pentavalentes sistêmicos, que se apresentam na forma de Antimoniato de *N*-metil glucamina (Glucantime®) no Novo Mundo e Estibogluconato de sódio (Pentostan®) no Velho Mundo e países de língua inglesa. Com exceção da Índia, onde os antimoniais foram substituídos pela anfotericina B devido à resistência, e a Guiana Francesa na qual mais de 90% da LC é causada pela *L. guyanensis* e o tratamento de escolha é a pentamidina (MICHELETTI e BEATRIZ, 2012; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; CHAKRAVARTY et al., 2019).

Os principais pontos negativos da terapia com antimoniais são os comprovados altos índices de surgimento de resistência, os regimes de tratamento com altas doses por longos períodos e administração por via parenteral. Além disso, é contraindicada a administração em gestantes, cardiopatas, nefropatas e hepatopatas, justamente por seu potencial arritmogênico, culminando em fibrilação ventricular, batimentos ventriculares prematuros e alta toxicidade renal (JORDA et al., 2011; MICHELETTI e BEATRIZ, 2012).

Como medicamentos de segunda escolha estão as pentamidinas e a anfotericina B, as quais também apresentam efeitos colaterais similares aos antimoniais pentavalentes. Um efeito que chama atenção na anfotericina B é sua elevada nefrotoxicidade, resultante da diminuição da taxa de filtração glomerular devido à vasoconstrição nas arteríolas aferentes, culminando a curto prazo em hipocalemia e hipomagnesemia. Já as pentamidinas demonstram severos efeitos colaterais, como toxicidade renal e hepática, hipotensão, disglicemia, pancreatite e complicações cardíacas. Ambos fármacos apresentam um elevado custo. Adicionalmente, devido a estes efeitos e várias implicações em comum dentre os

medicamentos, como náuseas, vômitos, dor abdominal, prurido, cefaleia, tontura, edema, artralgia, entre outros, muitos pacientes desistem do tratamento e a doença pode progredir com sérias complicações, além do desenvolvimento de resistência aos medicamentos (MICHELETTI e BEATRIZ, 2012; MARGARET et al., 2012).

Devido às complicações com a terapia atual para leishmaniose, a busca por novos medicamentos e o desenvolvimento de novos tratamentos para as leishmanioses apontam para a necessidade de terapias alternativas, capazes de propiciar maior efetividade, acessibilidade financeira, menor toxicidade, melhores efeitos estéticos e menores índices de resistências aos hospedeiros infectados. Estudos têm indicado a eficácia do uso de terapias alternativas para o tratamento da leishmaniose. Nesse cenário, a TFD vem despontando como um tratamento promissor para a LC (ASILAN e DAVAMI, 2006; AKILOV et al., 2009; FINK et al., 2016).

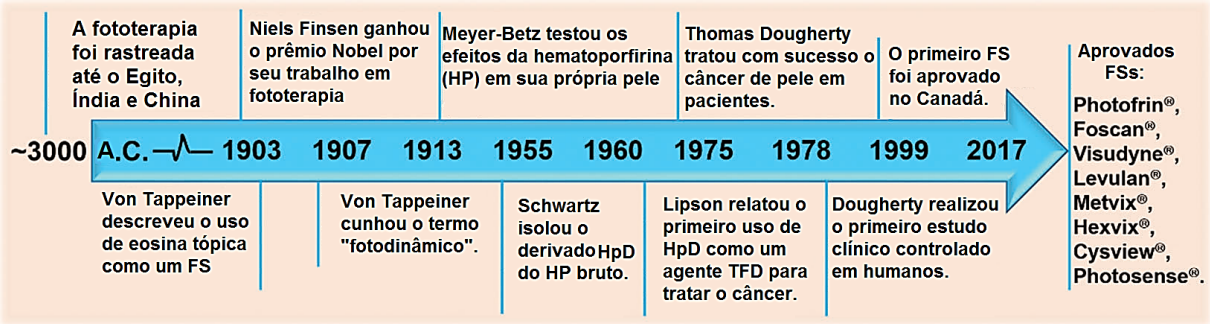
3.6 Terapia Fotodinâmica

Relatos de mais de 3.000 anos descrevem o uso da combinação da luz e agentes químicos (extratos de plantas) no tratamento do vitiligo, pelos antigos egípcios e habitantes da Índia. Em Munique, na Alemanha, no início do século XX, teve origem a TFD. Tudo começou quando Oscar Raab e seu professor Herman Von Tappeiner observaram a morte rápida de um protozoário (*Paramecium caudatum*) ao ser incubado com o corante laranja de acridina e exposto a luz, supostamente devido a efeitos de fotossensibilização. Após algum tempo, foi descoberto que a presença do oxigênio era essencial para ocorrer a reação. Em 1907, foi lançado um livro por Von Tappeiner e Jodlbauer sobre este processo de fotossensibilização dependente do oxigênio, voltado para terapêutica no tumor cutâneo e destruição de microrganismos infecciosos. Também no início do século XX, a importância da luz no tratamento de doenças foi reconhecida e o Prêmio Nobel de Fisiologia/Medicina de 1903 foi concedido a Niels Finsen, que demonstrou que os raios luminosos têm efeito sobre tecidos orgânicos, como a pele. De modo sucinto, a **Figura 7** mostra em ordem cronológica alguns dos principais acontecimentos relacionados ao avanço da TFD até o ano de 2017 (TAUB et al., 2004; LI; LEE; YOON, 2018).

A TFD é uma modalidade terapêutica que tem sido bastante utilizada no tratamento do câncer. Na dermatologia, o uso da TFD é amplamente aceito. Por exemplo, é utilizada no tratamento do câncer de pele não-melanocítico e outras doenças inflamatórias e não neoplásicas como: psoríase, doença de Darier, sarcoidose e ceratose actínica. Nas últimas

décadas, houve um crescimento enorme da TFD e suas aplicações (SNOEK et al., 2008; TOREZAN et al., 2009).

Figura 7: Linha do tempo relacionada ao desenvolvimento da TFD ao longo da história.



Fonte: Adaptado de LI; LEE; YOON, 2018.

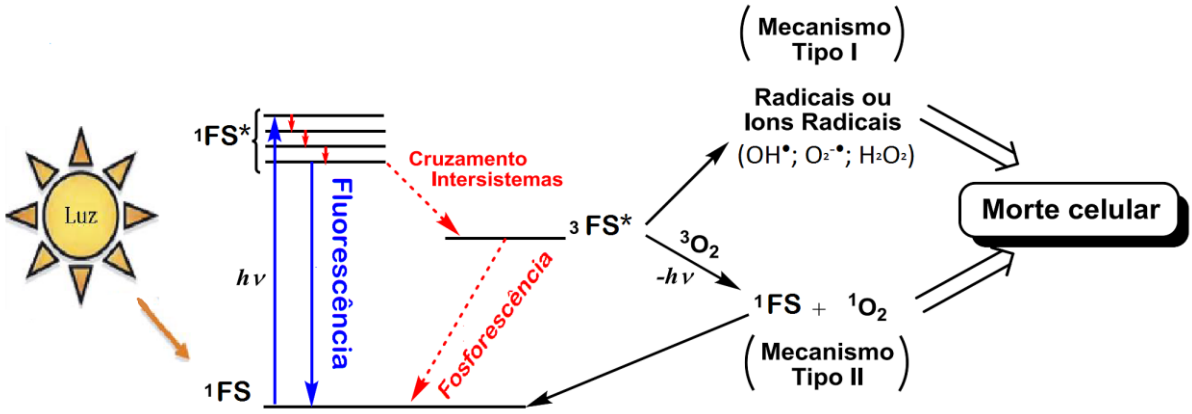
As fontes de luz disponíveis para TFD contemplam lâmpadas de amplo espectro, LEDs (*light emitting diodes*) e lasers. Os LEDs são fontes de luz não coerentes muito utilizadas na TFD. Os LEDs são aparelhos de fácil uso, meia vida longa e baixo custo. Essas fontes são constituídas por semicondutores que emitem luz com potências variadas com bandas espectrais relativamente estreitas (< 100 nm) (RAMOS, et al., 2018).

Quanto ao seu mecanismo de ação, a TFD precisa de três componentes: (1) o FS, (2) presença de oxigênio e (3) uma fonte de luz ressonante ao FS (ou seja, que tenha comprimento de onda contido no espectro de absorção do FS). Esta técnica se baseia em duas etapas: primeiramente o FS se acumula na célula/tecido alvo e em um segundo momento estas células/tecido são iluminadas por uma fonte de luz adequada para cada FS, levando à sua ativação através da absorção de energia, e consequentemente causando a destruição do alvo, na presença de oxigênio, devido à geração de EROs. Essas espécies reativas são capazes de interagir com diversos componentes biológicos (lipídios, proteínas, etc), acarretando em defeitos funcionais e culminando na morte celular. Estudos utilizando microscopia de fluorescência sugerem que a fototoxicidade mitocondrial é a principal causa da morte celular induzida pela TFD (DAI; HUANG; HAMBLIN, 2009; TOREZAN et al., 2009; LI; LEE; YOON, 2018).

O processo se baseia inicialmente na ativação do FS pela fonte de luz levando-o de seu estado fundamental (^{1}FS) ao estado ativado ^{1}FS* (singleto excitado) de meia vida curta, essa ativação se dá através da absorção da luz. Quando os elétrons (e^-) retornam ao ^{1}FS, perdem energia em forma da fluorescência. No entanto, os elétrons podem também realizar

cruzamento intersistema, passando para o estado ^{3}FS* (tripleto excitado). Este estado é menos energético quando comparado ao estado singleto excitado, porém, apresenta um tempo de vida bem mais longo, microssegundos em oposição à nanossegundos. O retorno destas moléculas ao estado fundamental envolve perda de energia por fosforescência (**Figura 8**) (OLIVEIRA et al., 2015; NUNEZ, RIBEIRO, GARCEZ, 2015).

Figura 8: Mecanismo geral da terapia fotodinâmica na geração de espécies reativas de oxigênio mediado pela luz. **FS** – fotossensibilizador.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al., 2015.

Nesse processo, ocorrem interações conhecidas como reações do tipo I e do tipo II. Na reação do tipo I, o FS interage diretamente com as moléculas de seus arredores, permitindo a transferência de elétrons, a qual leva à formação de espécies reativas de oxigênio tais como o superóxido ($O_2^{-\bullet}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila ($OH^{\bullet}$). Essa cascata de reações iniciada leva ao estresse oxidativo resultando na destruição celular (NUNEZ, RIBEIRO, GARCEZ, 2015; KWIATKOWSKI et al., 2018).

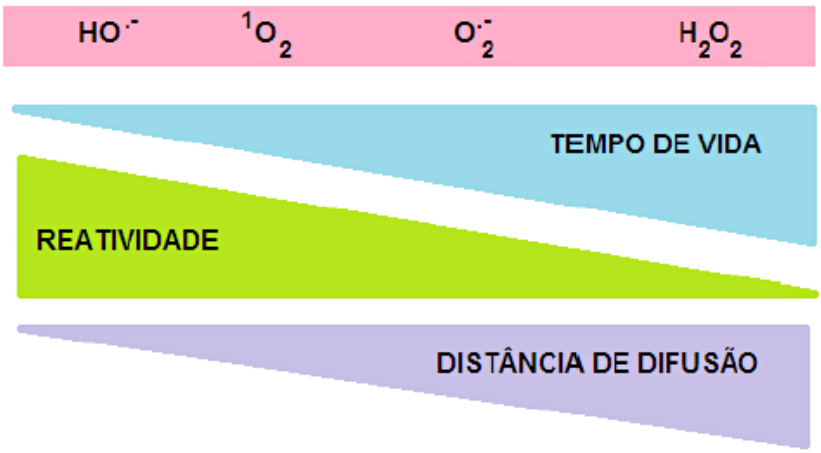
No mecanismo do tipo II, ocorre a transferência direta de energia ao oxigênio molecular (estado fundamental tripleto) situado no microambiente, levando à produção de oxigênio singleto ($^{1}O_2$). O $^{1}O_2$ caracteriza-se por ser uma espécie altamente reativa de oxigênio, capaz de oxidar instantaneamente biomoléculas constituintes das membranas biológicas como os lipídios insaturados, triacilgliceróis, fosfolipídios e o colesterol, os quais estão presentes na membrana plasmática, mitocondrial, lipossomal, nuclear e no retículo endoplasmático. A oxidação desses constituintes celulares tanto pelo $^{1}O_2$, quanto pelas outras EROs, pode promover alterações na permeabilidade e função de transporte entre os meios intra e extracelular. Componentes básicos na estrutura das proteínas, resíduos de aminoácidos (triptofano, histidina, metionina e cisteína) presentes em diversas proteínas e bases de ácidos

nucléicos, tais como guanina e guanosina, também são alvos da ação das EROs (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010; TEGOS et al., 2012; CULLIGAN; FRIEDBERG, 2018).

Vale ressaltar que para a eficiência destes mecanismos, vários fatores são relevantes, tais como: concentração de oxigênio, pH, estrutura do FS, entre outros. A geração de EROs pelo mecanismo tipo II é esquematicamente mais simples de ocorrer, mas à medida que o oxigênio se esgota, o mecanismo tipo I começa a prevalecer (KWIATKOWSKI et al., 2018). Além da alta geração de EROs, a localização intracelular do FS é um fator primordial, o que pode ser provado pela maior eficiência dos FSs anfifílicos em sistemas miméticos de membrana plasmática, pois são essenciais para a oxidação de biomoléculas que estão próximas, como os lipídios de membrana (BACELLAR et al. 2018).

Tanto a geração de EROs (KWIATKOWSKI et al., 2018) quanto a localização do FS na célula alvo (BACELLAR et al. 2018) são pontos críticos para a eficácia da TFD, pois a ação das EROs se limitam ao seu local de acumulação. Tomamos como exemplo o tempo de vida do $^1O_2$, que é muito curto, aproximadamente 10 - 320 nanossegundos, por isso sua difusão se limita a aproximadamente à distância de 10 nm a 55 nm nas células. A relação entre o tempo de vida, a reatividade e a distância de difusão do $^1O_2$ e as demais EROs encontra-se representada na **Figura 9**. Portanto, diante dos fatos apresentados, um fator primordial na TFD é a escolha apropriada do FS (AGOSTINIS et al., 2011; KWIATKOWSKI et al., 2018).

Figura 9: Comparação entre o tempo de vida, a reatividade e a distância de difusão entre os EROs.



Fonte: REDMOND, 2006; ALVES, 2014.

3.7 Fotossensibilizadores

Os FSs são compostos que absorvem energia luminosa em comprimentos de onda ressonantes à sua banda de absorção, o que desencadeia uma série de reações na presença da molécula de oxigênio, que resulta na morte das células alvo, através da geração de EROs, conforme descrito na seção anterior. Existem vários compostos que vêm sendo descritos na literatura e testados como FSs, alguns são até utilizados comercialmente. Dentre eles, podem ser citados compostos da classe dos fenotiazínicos (corantes como o azul de metileno e o azul de toluidina), os compostos porfirínicos (dentre eles as porfirinas de base livre e as metaloporfirinas, as clorinas e bacterioclorinas e as ftalocianinas) e o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) (MOREIRA et al. 2012; ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016).

Independente da classe dos FSs, algumas propriedades favorecem sua utilização na TFD como, por exemplo, sua síntese deve ser relativamente fácil e um FS ideal deve apresentar múltiplos alvos na célula para ser mais efetivo. A **Tabela 1** apresenta algumas das características desejáveis para um FS.

Tabela 1: Características de um fotossensibilizador modelo.

PROPRIEDADES	CARACTERÍSTICAS
FÍSICO-QUÍMICAS	• Alta pureza química; • Alto coeficiente de extinção molar; • Apresentar carga positiva; • Alta estabilidade e baixa tendência à agregação.
FOTOFÍSICAS	• Longo tempo de meia-vida no estado tripleto; • Alta produção de EROs; • Resistência ao fotobranqueamento.
FARMACOLÓGICAS	• Acumulação no tecido alvo em administrações sistêmicas; • Eliminação sistêmica rápida e segura do organismo; • Nenhuma ou baixa toxicidade sistêmica.
FOTOTERAPÊUTICAS	• Nenhuma ou baixa toxicidade no escuro; • Ausência de potencial mutagênico ou carcinogênico; • Destruição preferencial e eficiente do seu alvo biológico.

Fonte: ALVES, 2014; PAN et al., 2018.

Tanto a lipofilicidade quanto a carga do FS são fatores primordiais que afetam sua captação e localização na célula alvo. Há porfirinas, por exemplo, que podem se acumular na mitocôndria de células de câncer, induzindo à sua morte por meio da apoptose e necrose

(VAN STRATEN et al., 2017). Já os fenotiazínicos são amplamente estudados para aplicações antimicrobianas e menos frequentemente utilizados para o câncer. Sua carga catiônica pode rapidamente se ligar e invadir as células microbianas, demonstrando alto grau de seletividade para atingir microrganismos (PLOTINO; GRANDE; MERCADE, 2018). O 5-ALA é um precursor da protoporfirina IX (Pp IX), que tornou-se um FS de escolha na terapia de lesões pré-malignas e malignas da pele. Aprovado pela "*Food and Drug Administration*" (FDA) dos EUA em 2000, esses derivados de ALA são considerados "pró-fármacos", que precisam ser convertidos metabolicamente em (Pp IX) para se tornarem FSs ativos (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; VAN STRATEN et al., 2017).

No início da aplicação da TFD, apenas um número limitado de substâncias estavam disponíveis para aplicação como FS. Porém, durante as duas últimas décadas, foram reconhecidas e sintetizadas novas substâncias direcionadas para o uso na TFD. Os FSs foram distintivamente divididos em gerações baseadas no período de desenvolvimento e em suas características específicas. Muitos foram desenvolvidos inicialmente para aplicação da TFD no tratamento do câncer. Os FSs de primeira geração foram as hematoporfirinas (Hp) que surgiram no século XIX. Utilizando a Hp nos anos 60, Lipson relatou um caso de tratamento bem-sucedido de neoplasias de mama (LIPSON et al., 1966). Porém, devido a sua natureza heterotípica, grandes doses eram necessárias para alcançar os efeitos desejados (BENOV, 2015; VAN STRATEN et al., 2017).

O primeiro FS aprovado para uso na clínica foi o Photofrin®, um derivado direto da Hp, que foi obtido após sua purificação e manipulação. Logo após, surgiram outros compostos derivados das porfirinas, como o Photosan® e Photocan®, ambos também aprovados pela FDA para uso na clínica no tratamento de cânceres e pré-câncer. Porém, o Photofrin® ainda era uma mistura complexa de moléculas, as quais apresentavam algumas limitações, como baixa seletividade no tecido alvo e lenta eliminação sistêmica no organismo. Devido ao baixo coeficiente de extinção molar, uma alta dosagem de Photofrin® era necessária para atingir o efeito terapêutico, levando à sensibilidade prolongada da pele do paciente após a TFD (ALVES, 2014; VAN STRATEN et al., 2017).

Estes efeitos indesejados levaram à necessidade da síntese de FSs de segunda geração, com o objetivo de aumentar a seletividade e reduzir a dose do medicamento. Em comparação aos da primeira geração, os FSs de 2ª geração apresentam uma maior produção de EROs e um maior nível de pureza e reprodutibilidade. Alguns exemplos são o Levulan® e o Foscan®.

Outro ponto positivo foi que as propriedades desses novos FSs foram ajustadas de modo a utilizar a absorção de luz em comprimentos de onda maiores, para que possam ser usadas no tratamento de tumores em tecidos mais profundos (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; VAN STRATEN et al., 2017).

Por fim, os FSs de terceira geração tratam-se de FSs de segunda geração associados a lipossomas, anticorpos e nanopartículas, por exemplo. Isto garante uma maior seletividade e segurança para seu uso sistêmico, podendo ser direcionados a agentes causadores da doença ou células específicas, minimizando injúrias causadas aos tecidos sadios adjacentes. Os FSs podem ainda serem produzidos endogenamente, como algumas porfirinas (DUTTA; WAKI; CHANG, 2012; VAN STRATEN et al., 2017).

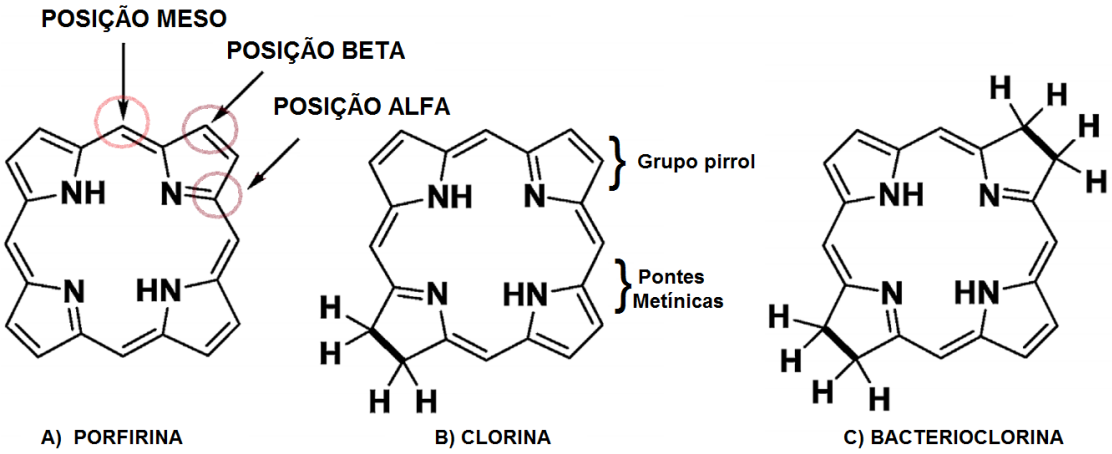
Embora a TFD tenha sido desenvolvida inicialmente e avançado mais no tratamento do câncer, este avanço nas pesquisas propiciou uma busca geral por FSs mais eficientes. A partir dos anos 90, percebeu-se que a TFD poderia também exercer um eficiente efeito antimicrobiano, se fosse possível projetar FSs que pudessem se ligar preferencialmente à microrganismos, em relação às células dos mamíferos. Para tratamentos antimicrobianos, o termo Inativação Fotodinâmica (IF), ao invés de TFD, é frequentemente aplicado. O azul de metileno (AM) e azul de toluidina são muito utilizados para IF por serem catiônicos e em geral pouco tóxicos para células de mamíferos (HAMBLIN, 2016). Esses FSs vêm sendo capazes de diminuir a viabilidade de várias espécies de bactérias tanto *in vitro* quanto *in vivo* (MELO et al., 2013).

Dados como esses indicam o grande leque de possibilidades de aplicação da TFD no tratamento de várias condições, abrangendo diversas doenças infecciosas, incluindo dermatoses, periodontites, parasitoses, dentre outras. A TFD vendo sendo testada em uma ampla gama de microrganismos, incluindo bactérias Gram positivas e negativas (THOMAS et al., 2015; SAH et al., 2019), protozoários (ANDRADE et al., 2018), vírus (BUZZÁ et al., 2019) e fungos (CAI et al., 2018), os quais demonstraram suscetibilidade ao tratamento fotodinâmico. Outro exemplo está relacionado ao ALA, um FS derivado das porfirinas, que apesar de ter sido desenvolvido para terapia do câncer, também vem sendo testado em microrganismos, a exemplo disto estão os tratamentos clínicos em pacientes utilizando ALA e seus derivados no combate à LC (ASILAN; DAVAMI 2006; JOHANSEN; JEMEC; FABRICIUS 2019).

3.7.1 Porfirinas

O conceito de porfirina vem do grego πορφύρα, *porphura*, que significa “pigmento púrpura”. As porfirinas são FSs baseados em uma estrutura formada por quatro anéis pirrólicos, unidos entre si por pontes meso-metínicas (CH), formando um macrociclo composto por 20 átomos de carbonos e 4 átomos de nitrogênio. Dentre seus derivados naturais essenciais para o organismo, destacam-se o grupo heme e as clorofilas, e estão presentes também nos citocromos, responsáveis pela transferência de elétrons na cadeia respiratória, de mitocôndrias (SMITH, 1975; ALVES, 2014). As porfirinas e seus derivados têm atraído uma grande atenção em relação à TFD (em geral, em tratamentos relacionados ao câncer), devido à possibilidade de modular suas propriedades fotofísicas e biodisponibilidade através da ampla escolha e planejamento dos substituintes periféricos, os quais podem ser ligados tanto aos sítios pirrólicos, quanto às posições *meso* nas pontes de metínicas. Outro fator que chama atenção são os átomos de nitrogênio no interior, os quais formam uma cavidade central perfeitamente posicionada para complexação de um íon metálico. Outros compostos derivados da clorofila, utilizados como FSs, também apresentam estrutura derivada da porfirina, como a clorina e a bacterioclorina (**Figura 10**), (MILGROM, 1997; PAN et al., 2018; TIAN; ZHANG, 2019).

Figura 10: Estrutura geral do núcleo porfirínico e seus derivados, clorinas e bacterioclorinas.



Fonte: Adaptada de TIAN; ZHANG, 2019.

A nomenclatura das porfirinas se baseia no tipo e posição dos substituintes no anel porfirínico. Elas podem ser classificadas em arilporfirinas, quando possuem substituintes nos anéis aromáticos (cadeias fechadas aromáticas) ou em alquilporfirinas, quando possuem substituintes alifáticos (cadeias abertas). Ainda de acordo com a nomenclatura, quando os

substituintes das posições *meso* do anel porfirínico são iguais, usa-se o prefixo *tetrakis*. As chamadas porfirinas de base livre, exemplificada na **Figura 10**, possuem dois átomos de hidrogênio ligados aos nitrogênios centrais. Por outro lado, as porfirinas que possuem metais complexados ao centro do anel macrocíclico são denominadas de metaloporfirinas. As metaloporfirinas resultam justamente dessa troca dos dois átomos de hidrogênio centrais da porfirina de base livre por um cátion metálico, como por exemplo, Cu^{2+}, Fe^{3+}, Zn^{2+} ou Ni^{2+} (BEGA et al., 2008; PEIXOTO, 2012; TIAN; ZHANG, 2019).

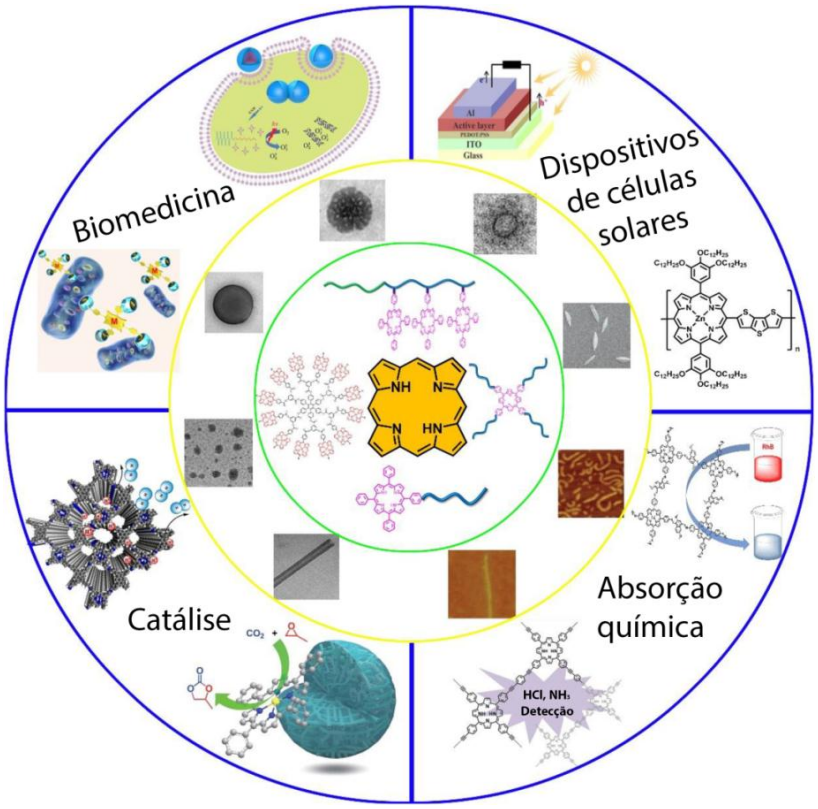
Os derivados das porfirinas podem apresentar alta geração de EROs. Em casos de tratamento do câncer, elas apresentam preferência de acumulação nas células tumorais comparadas ao tecido normal, tanto *in vitro* como *in vivo*, e sua localização é majoritariamente encontrada nas estruturas de membrana devido à sua anfifilicidade (LONGEVIAL et al., 2017; PAN et al., 2018).

O grande interesse nestes compostos deve-se às suas características físicas e químicas como também suas potencialidades biológicas associadas à versatilidade estrutural da porfirina. Longevial et al. (2017) demonstraram que mudanças estruturais nas porfirinas melhoraram sua eficiência, através do aumento de sua fototoxicidade pertinente ao alto rendimento de produção de EROs, aprimorando assim, suas propriedades fotofísicas. O rearranjo dos substituintes na periferia do anel de porfirina afeta a forma da molécula, a distribuição de cargas e o grau lipofílico. Tais modificações podem aperfeiçoar as interações com os constituintes das células, o que eventualmente pode facilitar o fotodano aos componentes celulares mais críticos, levando à rápida e eficiente morte celular. As metaloporfirinas adequadamente projetadas podem ser uma alternativa promissora para a TFD, principalmente nos casos de resistência a antibióticos (ALENEZI et al., 2017).

Esta versatilidade das porfirinas propicia também estudos interdisciplinares, que visam a sua utilização para: (i) construções de polímeros funcionais para catalisadores, iniciadores e monômeros; (ii) desenvolvimento de células solares; (iii) preparação de quimiossensores e nanossensores para a detecção de íons e ânios metálicos; (iv) pode-se também utilizar estes compostos e seus derivados tanto no diagnóstico quanto no terapia, atualmente mais direcionados ao câncer, com o foco especial na TFD, apresentando resultados satisfatórios (**Figura 11**), (OLIVEIRA et al., 2015; RAGOUSSI; TORRES, 2015; DING; ZHU; XIE, 2016; TIAN; ZHANG, 2019).

Dentre as várias modificações, foi relatado que a quelação do íon Zn(II), a sua estrutura de macrociclo facilita a interação com as membranas celulares e aumenta a eficiência da morte celular. A associação com Zn(II) também tem sido frequentemente utilizada para estabilizar FSs derivados de porfirina, mantendo as propriedades fotofísicas necessárias para a TFD (PAVANI; IAMAMOTO; BAPTISTA, 2012; BENOV, 2015).

Figura 11: Representação esquemática da versatilidade das porfirinas aplicadas em diversas áreas do conhecimento.



Fonte: Adaptada de TIAN; ZHANG, 2019.

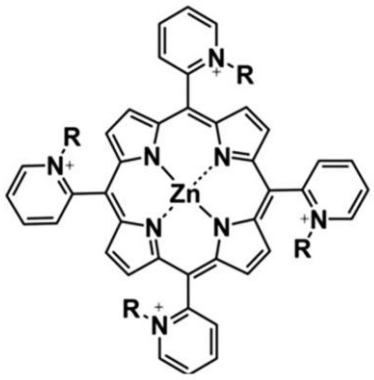
3.7.2 Zinco porfirinas (ZnPs)

Estudos apontam que a associação com o Zn(II) é uma boa estratégia para auxiliar na manutenção das propriedades fotofísicas⁄fotoquímicas dos FSs no ambiente intracelular, aumentando o tempo de vida do estado tripleto, e assim, ampliando a possibilidade de interação da molécula do FS ativado com o oxigênio ou alvos celulares. Também é relatado que, em comparação com seus análogos de base livre, a ZnP apresenta uma maior eficiência na morte da célula. Os dados também indicam que a acumulação de algumas ZnPs na mitocôndria induzem danos ainda mais proeminentes, levando à apoptose. Pavani, Iamamoto e Baptista (2012) demonstraram que células de adenocarcinoma cervical (HeLa), após serem

tratadas com ZnTC8PyP, apresentaram um alto percentual de citocromo c livre no citosol, o qual é responsável pela formação do apoptossoma. Sugere-se que a quelação com Zn(II) protege as propriedades fotoinduzidas das porfirinas no ambiente mitocondrial (BENOV; CRAIK; BATINIC-HABERLE, 2011).

As características das ZnPs que determinam sua captação, localização subcelular e, consequentemente, eficiência na TFD, além da fototoxicidade são: (i) a distribuição e a carga total para suportar interações eletrostáticas com biomoléculas e estruturas celulares; (ii) lipofilicidade e (iii) forma tridimensional da molécula. A vantagem do uso de ZnPs catiônicas como FS é que sua carga positiva é considerada uma característica importante para sua alta eficiência, devido a melhor interação com regiões negativamente carregadas da célula, como membrana plasmática e mitocôndria, que são estruturas alvos na TFD. Ensaios já provam que a absorção celular das porfirinas anfifílicas como a ZnTnHex-2-PyP^{4+} (ZnP hexil, **Figura 12**) é muito mais rápida do que a de análogos mais hidrofílicos, como a ZnTM-2-PyP^{4+} (EZZEDDINE et al., 2013; PLOTINO; GRANDE; MERCADE, 2018).

Figura 12: Estrutura da Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-n-hexilpiridinio-2-il)porfirina.



Fonte: Adaptada de EZZEDDINE et al., 2013.

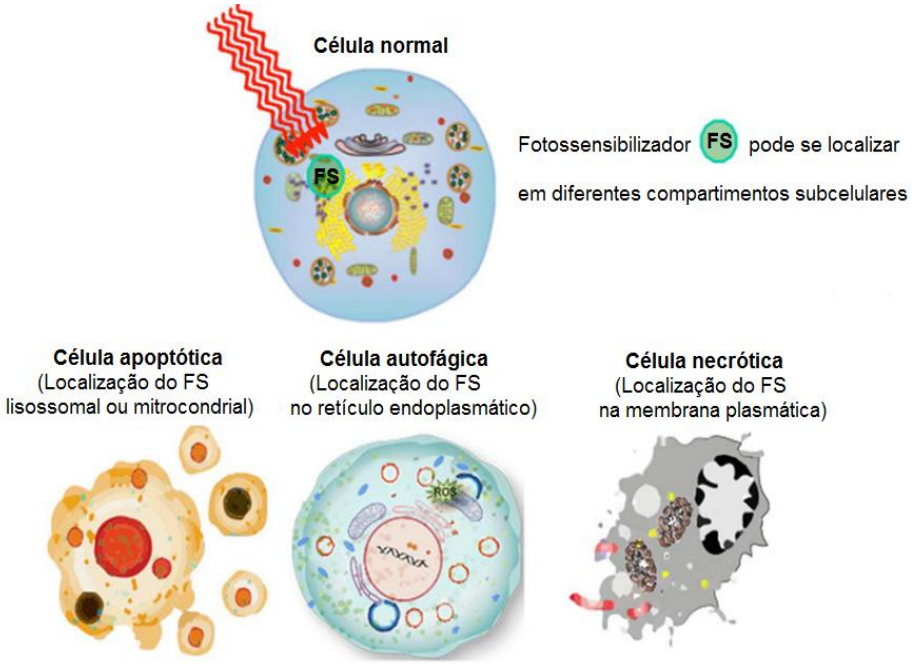
A presença de cadeias alifáticas laterais contendo um carbono (metil) garante à molécula caráter mais hidrofílico, enquanto que, as cadeias contendo seis carbonos (n-hexil) tornam a ZnTnHex-2-PyP^{4+} mais lipofílica. Já é comprovado que o aumento progressivo da cadeia alifática aumenta moderadamente a lipofilicidade da molécula e melhora sua absorção celular, e, portanto, promove um melhor efeito fotodinâmico (EZZEDDINE et al., 2013; ODEH et al., 2014). Pavani, Iamamoto e Baptista (2012) expuseram que as porfirinas que

apresentam longas cadeias alquílicas geraram indicadores de apoptose/necrose maiores do que as porfirinas que apresentavam grupos metílicos associados ao seu anel porfirínico e estes indicadores são ligeiramente maior para os compostos quelados com Zn(II).

Porém, o aumento demasiado na lipofilicidade de um FS não melhora sua fotoeficiência. Em um estudo realizado por Alenezi et al., (2017), o autor compara a ZnTnHex-2-PyP^{4+} à ZnTnOct-2-PyP^{4+}. A diferença estrutural entre as duas é a cadeia de dois átomos de carbono mais longa do análogo octilo e foi visto que independentemente do fato do isômero ZnP octil ser mais lipofílico e se acumular em níveis mais elevados, não exibiu maior fotoeficiência que seu análogo hexílico menos lipofílico. O que reforça a ideia de que a eficiência da TFD não depende apenas da quantidade de porfirina acumulada, mas também é afetada pela localização do FS dentro da célula (ALENEZI et al., 2017). Além disso, uma alta lipofilicidade pode dificultar a veiculação das porfirinas num ambiente aquoso.

Como citado anteriormente, um FS ideal deve apresentar alvos críticos celulares, visto que pode ocorrer a contribuição mútua de diferentes tipos de morte celular, por exemplo, os danos na mitocôndria podem levar a apoptose, a destruição e perda de integridade da membrana plasmática podem induzir necrose e danos nos lisossomos ou no retículo endoplasmático podem provocar autofagia, por exemplo, (**Figura 13**) (KWIATKOWSKI et al., 2018).

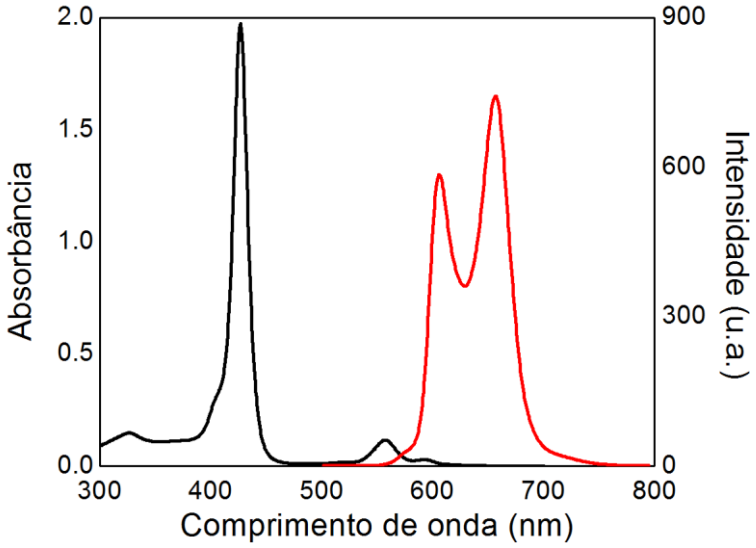
Figura 13: Mecanismo dominante de morte celular de acordo com a localização subcelular do FS nas diferentes organelas.



Fonte: ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016.

Normalmente, as porfirinas e seus derivados possuem uma intensa banda de absorção na faixa de aproximadamente 390 a 425 nm, na região do comprimento de onda azul, que é chamada de banda de Soret. Também possuem duas bandas de absorção de menores intensidades, chamadas de bandas Q, que estão localizadas na faixa de 500 - 700 nm na parte de baixa energia dos espectros (TIAN; ZHANG, 2019). Na **Figura 14**, está presente o espectro de absorção e emissão da ZnTnHex-2-PyP^{4+} (ZnP hexil), na concentração de 5 μM. O pico de absorção máximo está em torno de 426 nm, corresponde à banda de Soret, e duas bandas Q de emissão na região do vermelho com os picos em 606 nm e 656 nm.

Figura 14: Espectros de absorção (preto) e de emissão (vermelho) da ZnTnHex-2-PyP^{4+} 5 μM, diluída em tampão fosfato-salino. Excitação em 426 nm.



Fonte: O autor, 2019.

Devido à preocupação com o aumento da resistência bacteriana, a TFD também vem sendo utilizada no tratamento alternativo antimicrobiano e as ZnPs vêm sendo testadas como FSs (STAEGEMANN et al., 2017). Outras ZnPs análogas à adotada neste trabalho também já foram utilizadas, por exemplo, foi visto que a utilização da ZnTnHex-3-PyP^{4+} como FS foi capaz de eliminar com eficiência bactérias patogênicas (ALENEZI et al., 2017). Viana et al. (2015) demonstraram uma alta atividade microbicida da ZnTE-2-PyP^{4+} (ZnP etil) sobre culturas de *Candida albicans*. Além disso, segundo Abada et al., (2013) porfirinas e seus derivados podem atuar como potenciais agentes antiparasitários contra parasitas do gênero *Leishmania*, especialmente na LC, devido à penetrabilidade da luz. Trabalhos como o do nosso grupo, Andrade et al. (2018), comprovam a eficiência da ZnP etil como um agente terapêutico fotoativo promissor para essa leishmaniose. Atualmente, muitos dados sobre a eficiência das porfirinas e seus derivados na TFD estão sendo bem descritos na literatura,

porém grande parte de suas aplicações ainda está associada à área oncológica (YAP et al., 2018).

Benov et al. (2002) estudaram a influência das *N*-alquilpiridilporfirinas e seus complexos com Zn(II). As ZnPs se destacaram por serem FSs potentes dentre as metaloporfirinas, por exemplo, quando comparadas aos seus análogos de manganês, que se mostraram menos eficientes. Todas as porfirinas testadas queladas ou não com Zn, foram mais eficientes na indução da morte da *Echerichia coli* do que o derivado da Hp, mesmo sua versão purificada já estando disponível para uso clínico (Photofrin®). Verificou-se ainda que os isômeros da posição *orto* quelados com Zn(II) (assim como a ZnP utilizada neste trabalho) foram os mais eficientes na indução da fotoxidação do NADH *in vitro*. Outra coisa que chama atenção é que estudos relatam que a depender do tipo de célula, a eficiência individual do FS pode ainda ser maior (MORGAN; OSEROFF, 2001; BENOV et al., 2010).

Benov et al. (2010) observaram, que o aumento progressivo da lipofilicidade das *orto* Zn *N*–alquilpiridilporfirinas, à medida que as cadeias alquílicas são alongadas de metil para hexil, totalizando cinco ordens de grandeza, aumentou o acúmulo do FS nas células de adenocarcinoma de cólon (LS174T). Isso coincidiu com um aumento da morte fotodinâmica pelos análogos da ZnP na ordem: hexil > butil > metil. Experiências *in vivo* utilizando camundongos, comprovaram que análogos da ZnP etil mostraram-se acumular nas mitocôndrias das células (SPASOJEVIC et al. 2007). Em comparação, outros trabalhos indicam que seu análogo hexil, tendem a se acumular nas mitocôndrias também, porém em um nível superior ao dos seus derivados etil (BATINICHABERLE et al. 2010).

3.8 Terapia fotodinâmica no tratamento da leishmaniose cutânea

Devido à eficácia clínica da TFD nas doenças cutâneas localizadas e à crescente evidência de sua atividade antimicrobiana, pesquisadores iniciaram ensaios relacionados ao tratamento da LC e observaram resultados promissores (ALENEZI et al., 2017; AURELIANO et al., 2018). A TFD antiparasitária é uma abordagem emergente para o tratamento da LC, uma vez que não foram relatados grandes efeitos colaterais, contraindicações e resistência a parasitas até o momento. Diferentes condições de tratamento têm sido testadas, alterando-se parâmetros como: categoria e concentração do FS, tempo de irradiação e incubação, irradiância, entre outros (AURELIANO et al., 2018).

O ALA, por exemplo, é atualmente um pró-fármaco popular na TFD da classe das porfirinas, sendo metabolizado por células de mamíferos e microrganismos ao FS (Pp IX), como parte da via biossintética do heme. Ou seja, a absorção do ALA induz a produção e o acúmulo da Pp IX, que é substância fluorescente e eficaz como FS. Com subsequente iluminação com luz vermelha, o ALA e seus derivados têm sido usados para tratar pacientes no Oriente Médio e Europa com LC (FELÍCIO et al., 2008; VAN STRATEN et al., 2017).

Em um breve histórico, Enk et al. (2003) relataram um dos primeiros usos da TFD para LC no Velho Mundo, tratando 11 pacientes israelenses com um total de 32 lesões de LC causadas por *L. major*. Os pacientes foram tratados semanalmente com a TFD utilizando δ-ALA 10% e irradiado com a luz vermelha (100 J/cm^2). Com exceção de uma lesão, todas as demais se tornaram livres de amastigotas após apenas duas sessões de TFD. Asilan e Davami (2006), também relataram que, através da TFD, foi alcançada uma cura total de 29 e cura parcial de 2 das 31 lesões causadas por *L. major* quando tratadas com a TFD utilizando cloridrato de 5-ALA 10%, comparando-as com o sulfato de paromomicina, com o qual obtiveram apenas a cura de 14 das 34 lesões. Johansen, Jemec e Fabricius (2019), recentemente relataram o caso de um menino de 15 anos com LC, causada por *L. major*, multirresistente aos diversos fármacos convencionalmente utilizados. Neste caso, a aplicação da TFD duas vezes por semana, durante 12 semanas, utilizando o ALA como FS, resultou na cura e cicatrização completa da lesão.

No entanto, o custo do ALA ainda é alto para as populações necessitadas e os vários estudos citados anteriormente, foram ensaios randômicos. Ainda, apesar de vários estudos que indicam a ação da TFD, a literatura apresenta parâmetros extremamente distintos entre si, relacionados aos FSs, concentração, tempo e parâmetros de irradiação entre as várias metodologias empregadas. Kosaka et al. (2007) e Akilov et al. (2017) relataram que a eficiência do ALA na TFD provavelmente estaria ligada a uma destruição tecidual inespecífica acompanhada de um despovoamento de macrófagos mais do que qualquer morte direta de parasitas. Isso levou a se buscar novos FSs mais direcionados para a *Leishmania*.

Pinto et al. (2017) observaram que o (AM) como FS, juntamente com a TFD, foram capazes de diminuir a viabilidade das formas promastigotas da *L. major* e *L. braziliensis* em mais de 70% nas maiores concentrações testadas, porém, estas concentrações demonstraram leve toxicidade no escuro para ambas as espécies. Esses resultados corroboraram com os reportados por Song et al. (2011) que avaliaram *in vitro* o efeito do AM sobre *L. amazonensis*,

no escuro e após a TFD, através do teste de MTT. Foi observado que a interação com o AM no escuro diminuiu a viabilidade em até 50% na concentração mais alta testada (100 µM) enquanto que com a TFD na mesma concentração reduziu em 80%. Outro ponto que chama atenção foi o tempo de incubação de 1 hora entre o FS e a célula. Isso ocorre não só com o AM (PINTO et al. 2017), mas também com outros compostos utilizados na TFD, como a cúrcuma (PINTO et al., 2016) e alguns derivados de ftalocianinas (FC) (LONARDONI et al., 2018). Os resultados apresentados nestes estudos são indicativos de que o AM é um FS com promissor, porém, mais estudos ainda são necessários para melhor compreensão de seu mecanismo de ação e garantia de segurança e eficácia para uso clínico.

Viana et al. (2018) utilizaram FSs das classe das porfirinas e das FCs para uma dupla inativação fotodinâmica da *Leishmania*, com o propósito de seu uso efetivo como vacina. A *L. amazonensis* foi então duplamente foto-inativada, primeiramente através da captação endocítica de FC, e depois pela indução endógena por ALA de transfectantes uroporfirinogênicos para acumular uroporfirina citosólica I (URO). Os camundongos BALB/c vacinados com parasitos duplamente foto-inativados, tiveram um atraso significativo do início no desenvolvimento da lesão e uma diminuição substancial da carga parasitária.

No mesmo ano, Andrade et al. (2018) realizaram estudos *in vitro* utilizando a ZnP catiônica ZnTE-2-PyP^{4+} sobre a *L. braziliensis*, e relataram um declínio de cerca de 90% das formas promastigotas e uma redução em cerca de 40% do número de amastigotas por macrófago após aplicação fotodinâmica. Outra grande vantagem apresentada pelos compostos porfirínicos, como mostra a revisão de literatura de Annunzio et al. (2019), é a menor demanda da concentração para atingir o efeito desejado, quando comparado a outros FSs testados, como o AM (AURELIANO et al., 2018). Ressaltando, mais uma vez, a importância da localização intracelular do FS na célula (KWIATKOWSKI et al., 2018).

Além da aplicação contra doenças inflamatórias e infecciosas, estudos em pacientes demonstraram que a aplicação da TFD, em geral, além de ser eficaz contra a LC, também mostrou melhoras nos sinais de envelhecimento da pele, os resultados cosméticos foram promissores, quando comparados aos tratamentos convencionais. Estudos sugerem a ação da TFD para esse fim está associada ao aumento do tipo de colágeno e da espessura da pele. Além da melhora desse aspecto, nos testes em humanos apresentados não houve recidivas durante os 6 meses de acompanhamento pós-tratamento em todos os ensaios clínicos citados nesta sessão. No entanto, foram observados efeitos colaterais como eritema, sensação de

queimação durante a iluminação e subsequente hiperpigmentação, porém, nada significativo a ponto de desistir do tratamento, como acontece em pacientes durante o uso da medicação padrão (MICHELETTI e BEATRIZ, 2012; ANNUNZIO et al., 2019).

Portanto concluímos que a TFD apresenta um grande potencial para o tratamento da LC, porém mais estudos ainda são necessários, os quais levem a uma melhor compreensão da atuação dos FSs sobre os parasitas e à padronização de protocolos, para se alcançar tratamentos rápidos e eficazes, utilizando mínimas concentrações do FS e parâmetros de irradiação.

4 - REFERÊNCIAS

ABADA, Zahra et al. Synthesis and antiprotozoal activity of original porphyrin precursors and derivatives. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 67, p.158-165, 2013.

ABRAHAMSE, Heide.; HAMBLIN, Michael R.. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p.347-364, 2016.

AGOSTINIS, Patrizia et al. Photodynamic therapy of cancer: **An update. Ca: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 4, p.250-281, 2011.

AKHOUNDI, Mohammad et al. A historical overview of the classification, evolution, and dispersion of Leishmania parasites and sandflies. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 2016.

AKILOV, Oleg E. et al. Optimization of topical photodynamic therapy with 3,7-bis(di-n-butylamino)phenothiazin-5-ium bromide for cutaneous Leishmaniasis. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 41, p. 358–365, 2009.

AKILOV, Oleg 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, n. 8, p.651-660, 2007.

ALENEZI, Khazna et al. Optimizing Zn porphyrin-based photosensitizers for efficient antibacterial photodynamic therapy. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 17, p.154-159, 2017.

ALIANÇA, Amanda et al. The in Vitro Biological Activity of the Brazilian Brown Seaweed Dictyota mertensii against Leishmania amazonensis. **Molecules**, v. 19, n. 9, p.14052-14065, 2014.

ALVES, Jorge F. S. **Porfirinas e Terapia Fotodinâmica em Neoplasias**. Porto: Universidade Fernando Pessoa, 2014.

ANDRADE, Camila G. et al. Photodynamic effect of zinc porphyrin on the promastigote and amastigote forms of Leishmania braziliensis. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 17, n. 4, p.482-490, 2018.

ANNUNZIO, Sarah R. et al. Chlorin, Phthalocyanine, and Porphyrin Types Derivatives in Phototreatment of Cutaneous Manifestations: A Review**. International Journal Of Molecular Sciences**, v. 20, n. 16, p.12-22, 2019.

ASILAN, Ali; DAVAMI, Magid. 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.

AURELIANO, Débora P. et al. Cell death mechanisms in Leishmania amazonensis triggered by methylene blue-mediated antiparasitic photodynamic therapy. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 23, p.1-8, 2018.

BACELLAR, Isabel O. L. et al. Photosensitized Membrane Permeabilization Requires Contact-Dependent Reactions between Photosensitizer and Lipids. **Journal Of The American Chemical Society**, v. 140, n. 30, p.9606-9615, 2018.

BASTOS, Mônica M. et al. The Use of Porphyrins in Photodynamic Therapy of Cutaneous Leishmaniasis. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p.257-267, 2012.

BATINIC-HABERLE, Ines et al. Design of Mn porphyrins for treating oxidative stress injuries and their redox-based regulation of cellular transcriptional activities. **Amino Acids**, v. 42, n. 1, p.95-113, 2010.

BEGA, Paulo C. et al. **Síntese e caracterização da nova porfirina, meso-tetrakis (4-butoxi-3-metoxifenil) porfirina, e seus derivados metalados**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, p.91, 2008.

BENOV, Ludmil et al. Isomeric N-alkylpyridylporphyrins and their Zn(II) complexes: inactive as SOD mimics but powerful photosensitizers. **Archives Of Biochemistry And Biophysics**, v. 402, n. 2, p.159-165, 2002.

BENOV, Ludmil Photodynamic therapy: Current status and future directions. **Medical Principles and Practice**, v. 24, n. suppl 1, p. 14–28, 2015.

BENOV, Ludmil; CRAIK, James; BATINIC-HABERLE, Ines. Protein damage by photo-activated Zn(II) N-alkylpyridylporphyrins. **Amino Acids**, v. 42, n. 1, p.117-128, 2010.

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

BOLTON, Peter; DYSON, Mary; YOUNG, Steve. The effect of polarized light on the release of growth factors from the u-937 macrophage-like cell line**. Laser Therapy**, v. 4, n. 1, p.33-37, 1992.

BOURDEAU, Phillipe. et al. Short-term toxicity tests for non-genotoxic effects. **Chichester: Wiley**, 1990.

BRISTOW, Carrie-anne et al. Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 3, n. 3, p.162-167, 2006

BRITO, Maria 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.

BUZZÁ, Hilde H. et al. Preliminaries results of clinical study of condylomas acuminate using PDT with new illumination devices (Conference Presentation). **17th International Photodynamic Association World Congress**. p.1107029-0, 2019.

CAI, Qing et al. Successful Sequential Treatment with Itraconazole and ALA-PDT for Cutaneous Granuloma by Candida albicans: A Case Report and Literature Review. **Mycopathologia**, v. 183, n. 5, p.829-834, 2018.

CHAKRAVARTY, Jaya et al. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion On Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p.1251-1265, 2019.

CHAWLA, Bhavna et al. Paromomycin Affects Translation and Vesicle-Mediated Trafficking as Revealed by Proteomics of Paromomycin –Susceptible –Resistant Leishmania donovani. **Plos One**, v. 6, n. 10, p.e26660-1, 2011.

CULLIGAN, Melissa; FRIEDBERG, Joseph S. Photodynamic Therapy. **Modern Thoracic Oncology (In 3 Volumes)**, p. 247, 2018.

DAVID, Consuelo V.; CRAFT, Noah. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, v. 22, n. 6, p.491-502, 2009.

DING, Yubin; ZHU, Wei-hong; XIE, Yongshu. Development of Ion Chemosensors Based on Porphyrin Analogues. **Chemical Reviews**, v. 117, n. 4, p.2203-2256, 2016.

DUTTA, Sujoy; WAKI, Kayoko; CHANG, Kwang Poo. 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, Claes D. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with photodynamic therapy. **Archives of Dermatology**, v. 139, p. 432–434, 2003.

EZZEDDINE, Rima 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.

FELÍCIO, Lília B. A. et al. A terapia fotodinâmica com ácido 5-aminolevulínico como modalidade de tratamento para neoplasias cutâneas não-melanoma. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 83, n. 4, p.309-316, 2008.

FERNÁNDEZ, Marisa M.; MALCHIODI, Emilio L.; ALGRANATI, Israel 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.

FINK, Christine et al. Effective treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania tropica with topical photodynamic therapy. **Jddg**: **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 14, n. 8, p.836-838, 2016.

GARDLO, Kerstin et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 48, n. 6, p. 893–6, 2003.

GOSCH, Carina S. et al. American tegumentary leishmaniasis: epidemiological and molecular characterization of prevalent Leishmania species in the State of Tocantins, Brazil, 2011-2015. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, p.0-0, 2017.

GOTO, Hiro; LINDOSO, José A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010.

HAMBLIN, Michael R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion In Microbiology**, v. 33, p.67-73, 2016.

IQBAL, Hamid. et al. Therapeutic modalities to combat leishmaniasis, a review. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 6, n. 1, p. 1–5, 2016.

ISSA, Maria C. A.; MANELA-AZULAY, Mônica. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, p.11, 2010.

JARA, Marlene et al. Macromolecular biosynthetic parameters and metabolic profile in different life stages of Leishmania braziliensis: Amastigotes as a functionally less active stage. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. e0180532, 2017.

JIMÉNEZ-RUIZ, Antonio et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 1, p.104, 2010.

JOHANSEN, Mila B.; JEMEC, Gregor B. E.; FABRICIUS, Susanne. Effective treatment with photodynamic therapy of cutaneous leishmaniasis: A case report. **Dermatologic Therapy**, p.3-12, 2019.

JORDA, Radek et al. Anti-leishmanial activity of disubstituted purines and related pyrazolo[4,3-d]pyrimidines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 14, p.4233-4237, 2011.

KAMHAWI, Shaden. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes?. **Trends In Parasitology**, v. 22, n. 9, p.439-445, 2006.

KAYE, Paul; SCOTT, Phillip. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews**. Microbiology, v. 9, n. 8, p. 604-15, 2011.

KEVRIC, Ines; CAPPEL, Mark A.; KEELING, James H. New World and Old World Leishmania Infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p.579-593, 2015.

KOSAKA, Sachiko et al. A Mechanistic Study of δ-Aminolevulinic Acid-Based Photodynamic Therapy for Cutaneous Leishmaniasis. **Journal Of Investigative Dermatology**, v. 127, n. 6, p.1546-1549, 2007.

KWIATKOWSKI, Stanisław et al. Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p.1098-1107, 2018.

LAINSON, Ralph. Espécies neotropicais de Leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Ver Pan-Amaz Saude**, v.1, p.13-32, 2010.

LI, Xingshu; LEE, Songyi; YOON, Juyoung. Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 4, p.1174-1188, 2018.

LIEBMANN, Joerg; BORN, Matthias; KOLB-BACHOFEN, Victoria. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 130, n. 1, p. 259-269, 2010.

LIPSON, Richard L.; BALDES, Edward J.; GRAY, Mary J. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. **Cancer**, v. 20, n. 12, p. 2255-2257, 1967.

LONARDONI, M. V. et al. Phototoxic effect of aluminium-chlorine and aluminium-hydroxide phthalocyanines on Leishmania amazonensis promastigotes forms in photodynamic therapy. **International Journal Of Infectious Diseases**, v. 73, p.311-312, 2018.

LONGEVIAL, Jean-françois et al. Porphyrins Conjugated with Peripheral Thiolato Gold(I) Complexes for Enhanced Photodynamic Therapy. **Chemistry - A European Journal**, v. 23, n. 56, p.14017-14026, 2017.

MAMALIS, Andrew; GARCHA, Manveer; JAGDEO, Jared. Light emitting diode-generated blue light modulates fibrosis characteristics: Fibroblast proliferation, migration speed, and reactive oxygen species generation. **Lasers In Surgery And Medicine,** v. 47, n. 2, p.210-215, 2015.

MARGARET, A.; PHILLIPS E SAMUEL, L.; STANLEY, JR. Quimioterapia das infecções por protozoários: amebíase, giardíase, tricomoníase, leishmaniose e infecções por outros protozoários.cap. 50. In: **Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica**. AMGH Editora. 12 ed. p. P.1419-1441, 2012.

MARTINO, Antonio di et al. Enhancement of 5-aminolevulinic acid phototoxicity by encapsulation in polysaccharides based nanocomplexes for photodynamic therapy application. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B**: Biology, v. 175, p.226-234, 2017.

MELO, Wanessa Cma de et al. Photodynamic inactivation of biofilm: taking a lightly colored approach to stubborn infection. **Expert Review Of Anti-infective Therapy**, v. 11, n. 7, p.669-693, 2013.

MICHALICK; RIBEIRO, 2011 . Gênero Leishmania. In: NEVES, F.P. et al. **Parasitologia Humana** 12° Ed. São Paulo. Editora Atheneu. Cap. 7, p. 41-47, 2011.

MICHELETTI, Ana C.; BEATRIZ, Adilson. Progressos Recentes na Pesquisa de Compostos Orgânicos com Potencial Atividade Leishmanicida. **Revista Virtual de Química**, v.4, n. 3, p. 268-286, 2012.

MILGROM, Lionel R.; WARREN, Martin J. The colours of life: an introduction to the chemistry of porphyrins and related compounds. 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8a ed. Brasília: Ministério da Saúde, p. 271- 283, 2010.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**, 2ªed. atual. 3 ª reimpr. - Brasília, 2013.

MISHRA, Bhuwan B. et al. Aldaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v. 80, p. 81-90, 2009.

MOREIRA, Leonardo M. et al. Phenotiazinium Dyes as photosensitizers (PS) in photodynamic therapy (PDT): spectroscopic properties and photochemical mechanisms. In: **Advanced Aspects of Spectroscopy**. [s.v.]. p. 393–422, 2012.

MORGAN, Janet; OSEROFF, Allan R. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 49, n. 1-2, p.71-86, 2001.

NUNEZ, Silvia; GARCEZ, Aguinaldo S.; RIBEIRO, Martha S. **PDT-Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana na Odontologia**. Elsevier Brasil, 2015.

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

OLIVEIRA, Kleber T. 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.

OMS – Organização Mundial da Saúde. **Leishmaniasis**. Disponível em <http:// www.who.int/leishmaniasis/en/> Acesso em 2017.

PAN, Dong et al. Meso-substituted porphyrin photosensitizers with enhanced near-infrared absorption: Synthesis, characterization and biological evaluation for photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 74, n. 21, p.2677-2683, 2018.

PAVANI, Christiane; IAMAMOTO, Yassuko; BAPTISTA, Maurício 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, Isabelle 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.

PINTO, Juliana 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, Juliana 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.883-890, 2016.

PLOTINO, G.; GRANDE, N. M.; MERCADE, M. Photodynamic therapy in endodontics. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 6, p.760-774, 2018.

RAGOUSSI, Maria-eleni; TORRES, Tomás. New generation solar cells: concepts, trends and perspectives. **Chemical Communications**, v. 51, n. 19, p.3957-3972, 2015.

RAMOS, Rogério R. et al. **Terapia fotodinâmica: estudo comparativa de luz led e laser sobre propionibacterium acnes in vitro**. 2018.

REDMOND, Robert W.; KOCHEVAR, Irene E. Spatially Resolved Cellular Responses to Singlet Oxygen. **Photochemistry And Photobiology**, v. 82, n. 5, p.1178-1186, 2006.

SABINO, Caetano P. et al. Inactivation kinetics and lethal dose analysis of antimicrobial blue light and photodynamic therapy. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 28, p.186-191, 2019.

SAH, Upasana et al. Antimicrobial photodynamic therapy: Single-walled carbon nanotube (SWCNT)-Porphyrin conjugate for visible light mediated inactivation of Staphylococcus aureus. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 162, p.108-117, 2018.

SANTOS, Isabela B. dos et al. Leishmanicidal and Immunomodulatory Activities of the Palladacycle Complex DPPE 1.1, a Potential Candidate for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p.1427, 2018.

SAUER, Heinrich; WARTENBERG, Maria; HESCHELER, Juergen. Reactive Oxygen Species as Intracellular Messengers During Cell Growth and Differentiation. **Cellular Physiology And Biochemistry,** v. 11, n. 4, p.173-186, 2001.

SCARIOT, Débora 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, Suelen S. da et al. Propolis reduces Leishmania amazonensis-induced inflammation in the liver of BALB/c mice. **Parasitology Research**, v. 115, n. 4, p.1557-1566, 2015.

SIQUEIRA, Luciana B. O. et al. Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for Leishmania spp. **Nanotechnology**, v. 28, n. 6, p. 065101, 2017.

Sistema Nacional de Agravos de Notificações – **SINAN. Portal da saúde: DATASUS** [online]. Brasília: Ministério da Saúde; 2019 [cited 2019 Jan 12]. Available from: http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php? area=0203&id=29878153.

SNOEK, VAN DER et al. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. **Journal of The European Academy Of Dermatology And Venereology**, v. 22, n. 8, p.918-922, 2008.

SONG, Dennis et al. Photodynamic Therapy Using Methylene Blue to Treat Cutaneous Leishmaniasis. **Photomedicine And Laser Surgery**, v. 29, n. 10, p.711-715, 2011.

SPASOJEVIC, Ivan et al. Mn porphyrin-based superoxide dismutase (SOD) mimic, MnIIITE-2-PyP^{5+}, targets mouse heart mitochondria. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 42, n. 8, p.1193-1200, 2007.

STAEGEMANN, Michael H. et al. Mannose-Functionalized Hyperbranched Polyglycerol Loaded with Zinc Porphyrin: Investigation of the Multivalency Effect in Antibacterial Photodynamic Therapy. **Chemistry - A European Journal**, v. 23, n. 16, p.3918-3930, 2017.

STOCKDALE, Lisa; NEWTON, Robert. A review of preventative methods against human leishmaniasis infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 7, n. 6, p. e2278, 2013.

STROBER, Warren. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current protocols in immunology** / edited by John E. Coligan, 2015.

TAUB, Amy F. Photodynamic therapy in dermatology: History and horizons. **Journal of drugs in dermatology: JDD**, v. 3, n. 1 Suppl, p. S8-25, 2004.

TEGOS, George et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 120, 2012.

TEIXEIRA, Dirceu E. et al. Atlas didático: Ciclo de vida da Leishmania. **Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ**, 2013.

THOMAS, Milini et al. Amphiphilic cationic Zn-porphyrins with high photodynamic antimicrobial activity. **Future Microbiology**, v. 10, n. 5, p.709-724, 2015.

TIAN, Jia; ZHANG, Weian. Synthesis, self-assembly and applications of functional polymers based on porphyrins. **Progress In Polymer Science**, v. 95, p.65-117, 2019.

TOREZAN, Luís et al. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 445-459, 2009.

TORRES-GUERRERO, Edoardo et al. Leishmaniasis: a review. **F1000research**, v. 6, [s.n.], p.750-760, 2017.

TSIGANKOV, Polina et al. Regulation dynamics of leishmania differentiation: deconvoluting signals and identifying phosphorylation trends**. Molecular & Cellular proteomics.** v. 13, n. 7, p. 1787-1799, 2014.

VAN STRATEN, Demian et al. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. **Cancers**, v. 9, n. 12, p.07-12, 2017.

VIANA, Osnir 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.

VIANA, Sayonara M. et al. Photodynamic Vaccination of BALB/c Mice for Prophylaxis of Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania amazonensis. **Frontiers In Microbiology**, v. 9, p.165-169, 2018.

VIANNA, Elisa N. et al. Abundance of Lutzomyia longipalpis in urban households as risk factor of transmission of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p.302-310, 2016.

WANG, Yuguang et al. Photobiomodulation (blue and green light) encourages osteoblastic-differentiation of human adipose-derived stem cells: role of intracellular calcium and light-gated ion channels**. Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.33719-33719, 2016.

WHO – World Healthy Organization. **Leishmaniasis**. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 2018.

YAP, Steven Y. et al. Selective radiolabelling with 68Ga under mild conditions: a route towards a porphyrin PET/PDT theranostic agent. **Chemical Communications**, v. 54, n. 57, p.7952-7954, 2018.

5 - MANUSCRITO A SER TRADUZIDO E SUBMETIDO PARA A REVISTA JOURNAL OF PHOTOCHEMISTRY AND PHOTOBIOLOGY B: BIOLOGY

Avaliação *in vitro* do Efeito Fotodinâmico Associado à ZnTnHex-2-PyP^{4+} para o Tratamento da Leishmaniose Cutânea

T. H. S. Souza[1], C. G. Andrade[2], F. V. Cabral[3], B. S. Santos[4], J. F Sarmento-Neto[5], J. S. Rebouças[5], M. S. Ribeiro[3], R. C. B. Q. Figueiredo[6,#], A. Fontes[1,#,*]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – PPGCB, Recife – PE – Brasil.

[2] Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE – Brasil.

[3] Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Lasers e Aplicações, São Paulo – SP – Brasil.

[4] Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE – Brasil.

[5] Departamento. de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB – Brasil.

[6] Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães- Fundação Osvaldo Cruz, Recife – PE – Brasil.

[#]Supervisionaram esse estudo em conjunto.

*__Autor correspondente__: Adriana Fontes, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil. E-mail: adri-fontes@ufpe.br.

RESUMO

A inativação fotodinâmica (IF) está emergindo como uma alternativa promissora para o tratamento da leishmaniose cutânea (LC), pois a terapêutica atual é baseada em fármacos que apresentam alta toxicidade com casos de resistência reportados. A ZnTnHex-2-PyP^{4+} (ZnP hexil) é um derivado com grande potencial para a IF, não só por suas propriedades fotofísicas, como também por seu caráter catiônico e mais lipofílico – porém ainda hidrossolúvel – que podem acentuar sua interação celular. Assim, esse estudo objetivou investigar o efeito fotodinâmico *in vitro* mediado pela ZnP hexil na inativação de parasitas do gênero *Leishmania*. A ação fotodinâmica em promastigotas foi avaliada por (i) ensaios de viabilidade celular com azul de tripan e iodeto de propídeo, (ii) determinação do potencial da membrana mitocondrial, (iii) análise morfológica por microscopia de varredura eletrônica e (iv) interação celular por microscopia de fluorescência. Os resultados de viabilidade celular indicaram que a ZnP hexil, na menor concentração testada (0,62 μM) associada a IF (3,4 J/cm^2) culminou na inativação de mais de 95% das promastigotas. O tratamento fotodinâmico também levou a uma intensa despolarização e dano mitocondrial, bem como perda de formato fusiforme e enrugamento da membrana plasmática. A microscopia de fluorescência revelou uma marcação intracelular, em forma de agregados, pela ZnP ao longo do corpo do parasita com apenas 5 min de incubação. O efeito fotodinâmico também levou à redução de mais de 50% no número de amastigotas em macrófagos, após uma única sessão de tratamento. Não foi observada toxicidade considerável frente a células de mamífero. Dessa forma, o tratamento fotodinâmico mediado pela ZnTnHex-2-PyP^{4+} tem potencial para ser avaliado *in vivo* como uma alternativa para a LC.

Palavras chaves: porfirina; terapia fotodinâmica; *Leishmania amazonensis*.

1 - INTRODUÇÃO

A leishmaniose é considerada uma das doenças parasitárias mais comuns no mundo, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas. É caracterizada por ser uma doença tropical infecto-parasitária que acomete humanos e animais, causada por um parasita intracelular do gênero *Leishmania* [1]. A leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais comum desta doença, e no Novo Mundo costuma ser causada pelas espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*. 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 [2, 3].

Atualmente, os fármacos de escolha para o tratamento da LC são aplicados de forma sistêmica e apresentam alta toxicidade, o que limita o uso desses compostos. Além disso, já foram relatados casos de resistência do parasito aos tratamentos convencionais [4,5]. Surge então a terapia fotodinâmica (TFD). Essa modalidade terapêutica vem sendo amplamente explorada no câncer, mas também vem se apresentando como uma opção promissora para a inativação microbiana e parasitária, uma vez que pode favorecer um tratamento rápido e localizado [6, 7, 8].

A TFD é baseada na utilização de substâncias com propriedades fotossensibilizadoras e sua ativação pela luz, na presença de oxigênio. Após a irradiação, a ativação do fotossensibilizador (FS) resulta na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que levam a célula alvo à morte por estresse oxidativo. As vantagens da TFD frente à terapia padrão para a LC incluem administração local, procedimentos minimamente invasivos e, por ter vários alvos celulares e casos de resistência ainda não foram reportados [6, 9].

A literatura relata o uso de diferentes FSs combinados com diferentes parâmetros de irradiação para a inativação das espécies de *Leishmania* [10, 11]. Todavia, ainda se faz relevante a busca por novos FSs que possam ser eficientes aplicando menores concentrações, tempos de incubação e condições de irradiação, de modo a minimizar fotodanos a tecidos adjacentes. Além disso, uma melhor compreensão da interação biológica dos diferentes FSs pode também ajudar a ter cada vez mais procedimentos mais otimizados.

As porfirinas e seus derivados são compostos tetrapirrólicos que já vêm sendo utilizados como FSs na TFD para estudos (i) relacionados ao câncer [12], (ii) fungos [13], (iii) bactérias [14] e até (iv) parasitas [15], pois podem apresentar propriedades como carga positiva facilitando a interação com estruturas celulares e alta eficiência na geração intracelular de EROs [16]. Além disso, as porfirinas complexadas ao Zn(II) têm o potencial de serem FSs ainda mais eficazes do que seus análogos base livre, pois a quelação do Zn(II) na

estrutura das porfirinas, além de as deixarem mais estáveis, potencializa sua interação às membranas celulares [17, 18].

Recentemente, reportamos resultados promissores na inativação fotodinâmica de formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* utilizando a Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-etil-2-piridil)porfirina (ZnTE-2-PyP^{4+}, ZnP etil) [15]. Segundo a literatura, estudos realizados com células de mamíferos, indicaram que essa porfirina tende a se acumular preferencialmente nos lisossomos e/ou apresenta-se distribuída no citoplasma [19]. Por outro lado, esses estudos também relatam que o derivado Zn(II) *meso*-tetrakis(*N*-n-hexilpiridinio-2-il)porfirina (ZnTnHex-2-PyP^{4+}, ZnP hexil) pode ser potencialmente ainda mais eficaz por ser mais lipofílico – sem deixar de ser hidrossolúvel – propiciando maior interação com a célula, até mesmo com organelas essenciais para sua sobrevivência, como a mitocôndria.

Assim, devido (i) aos efeitos colaterais associados com a terapia atual para LC, (ii) a busca por tratamentos fotodinâmicos mais rápidos e efetivos utilizando condições de irradiação e concentrações de FS menores, (iii) os resultados promissores obtidos por nós para a ZnP etil e (iv) as potencialidades relatadas para a ZnP hexil, o presente estudo objetivou avaliar a ação *in vitro* da ZnTnHex-2-PyP^{4+} na inativação de parasitas do gênero *Leishmania* causadores da LC.

2 - METODOLOGIA

2.1 - Parasitas

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/77BR/LTB0016) foram cultivadas em meio Schneider (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado (Gibco) e 100 IU/mL de penicilina e 100 μg/mL de estreptomicina (Gibco). As células foram mantidas a 26 ºC e utilizadas durante o início da fase estacionária de crescimento (forma metacíclica). Formas promastigotas de *L. (V) braziliensis* (MHOM/BR/1975/M2903) foram também utilizadas.

As formas amastigotas de *L. amazonensis* foram obtidas a partir da infecção de macrófagos peritoneais BALB/c, por 14 h, utilizando a proporção de 5:1 (promastigotas:macrófagos). Para infecção, os macrófagos (5×10^5 células/poço) foram distribuídos em placas de 24 poços e mantidos em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB, a 37 °C e 5% CO_2.

2.2 - Ensaio Fotodinâmico

A ZnP hexil foi sintetizada a partir da alquilação do precursor Zn(II) *meso*-tetrakis(2-piridil)porfirina, usando uma adaptação do método descrito por Viana *et al*. [20] e apresentou características espectrais idênticas àquelas reportadas anteriormente [17].

Os ensaios fotodinâmicos para as formas promastigotas foram realizados em microplacas de 96 poços. Para tanto, em cada poço, foram adicionadas alíquotas (100 μL) preparadas em tampão fostato salino (PBS) 1 × contendo 1×10^7 células/mL + o sistema a ser avaliado, na proporção de 1:1 (volume:volume), com volume final de 200 μL.

Foram utilizadas duas concentrações da ZnP hexil, 0,62 e 1,25 μM, diluídas em PBS. Foram avaliados os seguintes grupos: (i) Controle – sem tratamento, no escuro; (ii) Luz – tratamento apenas com irradiação; (iii) ZnP 1,25 μM, sem irradiação (no escuro) e (iv) grupos do tratamento fotodinâmico, ZnP + Luz, incubação com a porfirina em uma das duas concentrações mencionadas acima, seguida de irradiação. Para todos os grupos contendo a ZnP hexil, as células foram incubadas com o FS por 5 min na ausência da luz. Os parâmetros utilizados foram baseados em ensaios anteriores realizados com a ZnP etil [15]. Como fonte de luz, foi utilizado um LED 410 ± 20 nm (LEDbox, Biolambda).

Foram avaliadas duas condições de irradiação: Luz 1 = *ca.* 19,1 mW/cm^2 por 3 min (exposição irradiante de *ca.* 3,4 J/cm^2) e Luz 2 = *ca.* 38,2 mW/cm^2 por 1 min (exposição irradiante de *ca.* 2,3 J/cm^2). Assim, foram constituídos quatro grupos tratados fotodinamicamente: TFD 1 (ZnP 0,62 μM + Luz 1); TFD 2 (ZnP 0,62 μM + Luz 2); TFD 3 (ZnP 1,25 μM + Luz 1) e TFD 4 (ZnP 1,25 μM + Luz 2). A irradiação foi aplicada diretamente sobre a placa, sem a utilização da tampa. Foram realizados experimentos em duplicatas em quatro ensaios independentes.

Após os respectivos tratamentos, foram realizadas as análises de viabilidade celular pelo método de exclusão com azul de tripan. Este método se baseia no princípio de que células viáveis são impermeáveis ao corante, enquanto células mortas absorvem o azul de tripan para seu citoplasma por perda de seletividade da membrana, permanecendo assim coradas [21]. Para o ensaio, foram utilizados 90 μL da suspensão de parasitos de cada condição avaliada, aos quais foram adicionados 10 μL do azul de tripan. Após homogeneizar e incubar por 5 min, o número de parasitos não corados (viáveis) foi contado em câmara de Neubauer.

Para os experimentos com as amastigotas, 500 μL de cada sistema a ser avaliado foram adicionados em placas de 24 poços contendo os macrófagos infectados por *L. amazonensis*. As condições de maior exposição irradiante (TFD 1 e TFD 3) foram escolhidas

para avaliar o efeito fotodinâmico nas amastigotas. Após o tratamento, as células foram coradas com panótico, segundo instruções do fabricante (Laborclin®). O número de amastigotas foi determinado através da análise de 100 células hospedeiras infectadas distribuídas em campos escolhidos aleatoriamente por microscopia óptica (Leica DM500). Os ensaios foram realizados em duplicatas, em três ensaios independentes.

2.3 - Ensaio de Citotoxicidade

Foram também realizados ensaios de citotoxicidade, relativos aos tratamentos aplicados, utilizando macrófagos medulares extraídos de camundongos BALB/c. Os macrófagos (1×10^5 células/poço) foram incubados *overnight* em estufa de 37 °C e 5% de CO_2, para que pudessem aderir à placa de 96 poços contendo meio RPMI-1640 com vermelho de fenol, suplementado com SFB 10% inativado.

Para realização do experimento, o sobrenadante foi retirado dos poços e foi acrescentada a ZnP hexil nas concentrações de 0,62 a 1,25 μM, (com exceção dos grupos controle e Luz, para os quais somente o PBS foi adicionado). Foi adotado também o tratamento com maior exposição irradiante. As placas foram irradiadas conforme descrito anteriormente para as formas promastigotas (item 2.2). Após o tratamento, as células foram lavadas e incubadas em meio RPMI-1640 sem vermelho de fenol contendo MTT 5 mg/mL (Brometo de (3-[4,5-dimetiltiazol-2il]-2,5-difeniltetrazolium azul; Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas na estufa a 37 ºC e 5% de CO_2 por 4 h. Após a incubação, o sobrenadante foi desprezado e os cristais formados foram solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) por 30 min e homogeneizados. A absorbância foi mensurada através do espectrofotômetro Spectramax M4, em 570 nm. Foram realizadas triplicatas de cada concentração, reproduzidas em três experimentos independentes.

2.4 - Marcação Celular das Formas Promastigotas com a ZnP Hexil

A fim de avaliar a interação do FS com as formas promastigotas, foram realizadas análises por microscopia confocal de fluorescência. A suspensão celular (1×10^6 células/mL) foi adicionada em placas para microscopia confocal (SPL) e incubada com a ZnP hexil na concentração de 5 μM, durante os tempos de 5 e 15 min. As amostras foram observadas através de um microscópio confocal de fluorescência ZEISS LSM 700, sob excitação em 458 nm e detecção a partir de 468 nm.

2.5 – Análise Morfológica das Formas promastigotas

Para avaliar os danos morfológicos nas promastigotas, foram realizadas análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Para tal, as células foram processadas como anteriormente reportado por Aliança et al. [22] e observadas em um microscópio eletrônico de varredura (JSM- 5600 LV, JEOL).

2.6 - Ensaios por Citometria de Fluxo

Para a avaliação dos efeitos do tratamento fotodinâmico na membrana plasmática dos parasitas, foi utilizada a sonda fluorescente Iodeto de Propídeo (IP; Sigma-Aldrich). Para tanto, as formas promastigotas (tratadas ou não) foram lavadas e incubadas com 30 μg/mL de IP por 15 min. As células foram analisadas em um citômetro de fluxo Accuri C6 (Becton-Dickinson). O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizado como controle positivo. Um total de 20.000 eventos foi adquirido para cada amostra utilizando o detector LP 670 nm. A excitação foi em 488 nm.

Para análise das possíveis alterações no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi M$) causadas pelo tratamento fotodinâmico nas formas promastigotas, foi utilizada a sonda fluorescente Rodamina 123 (Rh 123; Sigma-Aldrich). Os parasitas (tratados ou não) foram incubados com 10 μg/mL de Rh 123 por 15 min. Após, as células foram então analisadas por citometria de fluxo conforme reportado acima, utilizando o detector 533/30 nm. As variações na intensidade de fluorescência foram quantificadas a partir do índice de variação (IV), por meio da equação: IV = (MT - MC)/MC, onde MT é a mediana de fluorescência para parasitas tratados e MC é a do controle negativo (não tratado). Os valores negativos do IV caracterizam a despolarização da membrana mitocondrial, enquanto os valores positivos indicam uma hiperpolarização. Os ensaios por citometria de fluxo foram realizados em duplicata em dois experimentos independentes.

2.7 - Análise Estatística

As diferenças estatísticas entre os grupos foram avaliadas pelo teste t Student pareado, após avaliação da normalidade dos dados por Shapiro-Wilk. Foi utilizado o GraphPad Prism 7 (Graphpad). As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

2.8 - Considerações Éticas

Todos os experimentos realizados envolvendo animais seguiram as normas vigentes do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal do Instituto Aggeu Magalhães/ Fundação Oswaldo Cruz

e do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (CEUA- FIOCRUZ Nº 121/2017; IPEN-CNEN/SP Nº 189/2017).

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Avaliação do Efeito Fotodinâmico da ZnP hexil em Promastigotas

3.1.1 – Viabilidade Celular por Azul de Tripan

Considerando tanto as condições de irradiação quanto as concentrações da ZnP hexil (1,25 e 0,62 μM), todos os grupos fotodinamicamente tratados apresentaram mais de 99% de células mortas em comparação com o controle, assim como ilustra a **Figura 1**. Foram avaliadas concentrações de ZnP ainda menores que 0,62 μM (0,3 e 0,5 μM), porém, não atingiram um percentual de morte celular maior que 90% (dados não exibidos). Portanto, a incubação com o FS, seguida de irradiação causou um efeito drástico sobre os parasitas, indicando uma intensa diminuição no número de células viáveis. Os grupos tratados só com luz e com ZnP no escuro apresentaram resultados semelhantes ao controle.

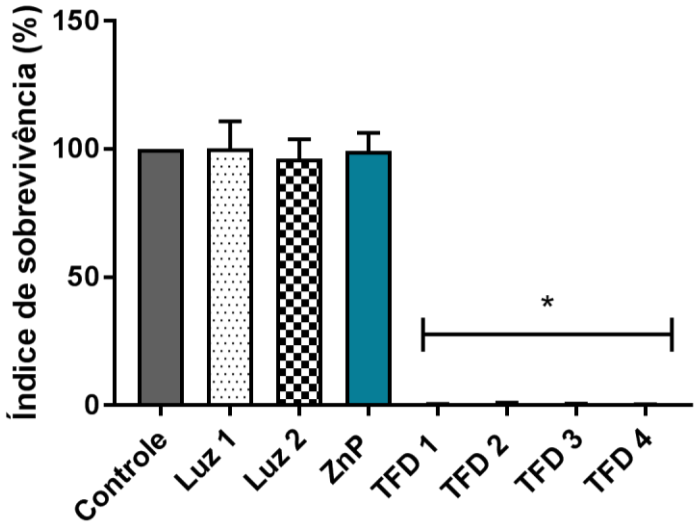


Figura 1 - Sobrevivência de promastigotas de *L. amazonensis* determinada pela contagem celular por azul de tripan, imediatamente após a exposição ao efeito fotodinâmico associado à ZnP. **Legenda: Luz 1 -** Irradiância 19,1 mW/cm^2 por 3 min (3,4 J/cm^2)**; Luz 2 -** Irradiância 38,2 mW/cm² por 1 min (2,4 J/cm^2); **ZnP -** ZnP 1,25 μM; **TFD 1 -** ZnP 0,62 μM + Luz 1; **TFD 2 -** ZnP 0,62 μM + Luz 2; **TFD 3 -** ZnP 1,25 μM + Luz 1; **TFD 4 -** ZnP 1,25 μM + Luz 2. *Grupos estatisticamente significantes ($p < 0,05$) quando comparados ao controle.

Pinto et al. [23], utilizando o tratamento fotodinâmico (10 J/cm²) mediado pela clorina e6 (400 μg/mL), alcançaram um decréscimo no número de promastigotas viáveis na faixa de 99% para *L. braziliensis* e 90% para a *L. major*, no entanto foi necessário um tempo de incubação de 1 h e a citotoxicidade não foi avaliada em células de mamíferos. Outro ensaio

[24] também indicou que o efeito fotodinâmico (10 J/cm²) associado ao azul de metileno (AM) foi capaz de diminuir o número de promastigotas de *L. major* e *L. braziliensis* viáveis em mais de 70% na maior concentração testada (500 μg/mL ~ 1600 μM). Mas, assim como em outros estudos [23, 25, 26], as amostras foram pré-incubadas por 1 h. Cabral et al. [27], também utilizando o AM (100 μM) na TFD (48,8 J/cm^2), atingiram um percentual de redução da viabilidade de cerca de 90% das formas promastigotas da *L. amazonensis*. Andrade et al. [15] aplicaram o tratamento fotodinâmico (90 J/cm²) mediado pela ZnP etil (10 μM) e observaram danos em cerca de 90% das promastigotas *L. braziliensis*.

Neste presente estudo, o protocolo descrito levou à inativação de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* em mais de 99% das células, aplicando uma menor exposição irradiante, menor tempo de irradiação, menor tempo de incubação (5 min) e uma concentração bem menor do FS do que nos estudos acima mencionados [15, 23-27].

3.1.2 – Viabilidade Celular por Iodeto de Propídeo

A fluorescência do IP é detectada em células que perderam a integridade da membrana plasmática, pois a alteração da sua permeabilidade permite a entrada desse marcador e consequente sua ligação ao DNA da célula, uma vez que em situações normais as células são impermeáveis ao IP [28]. A **Figura 2** ilustra as análises citométricas de marcação com IP das formas promastigotas de *L. amazonensis* submetidas ou não ao tratamento fotodinâmico.

Apenas 4,4% das células do grupo controle negativo (sem tratamento) apresentaram-se marcadas pelo IP (Figura 2A). Uma porcentagem semelhante de marcação foi observada para as células tratadas apenas com a ZnP hexil (1,25 μM, Figura 2C) ou células tratadas apenas com Luz 1 e Luz 2 (Figuras 2D a 2E). Por outro lado, 99,5% das células incubadas com H_2O_2 (controle positivo) apresentaram marcação pelo IP (Figura 2B), assim como as células dos grupos tratados fotodinamicamente (Figuras 2F a 2I), que exibiram uma marcação maior que 90%, mesmo quando a menor concentração de porfirina foi utilizada.

Estes dados indicam que as amostras fotodinamicamente tratadas apresentaram um aumento considerável na permeabilidade da membrana plasmática, levando à perda da viabilidade celular, corroborando com os dados apresentados com o corante azul de tripan (item 3.1.1). As células IP positivas são consideradas células em processo de necrose ou em apoptose tardia. Alguns estudos apontam que a apoptose tardia em parasitas do gênero *Leishmania* não é reversível [29, 30, 31].

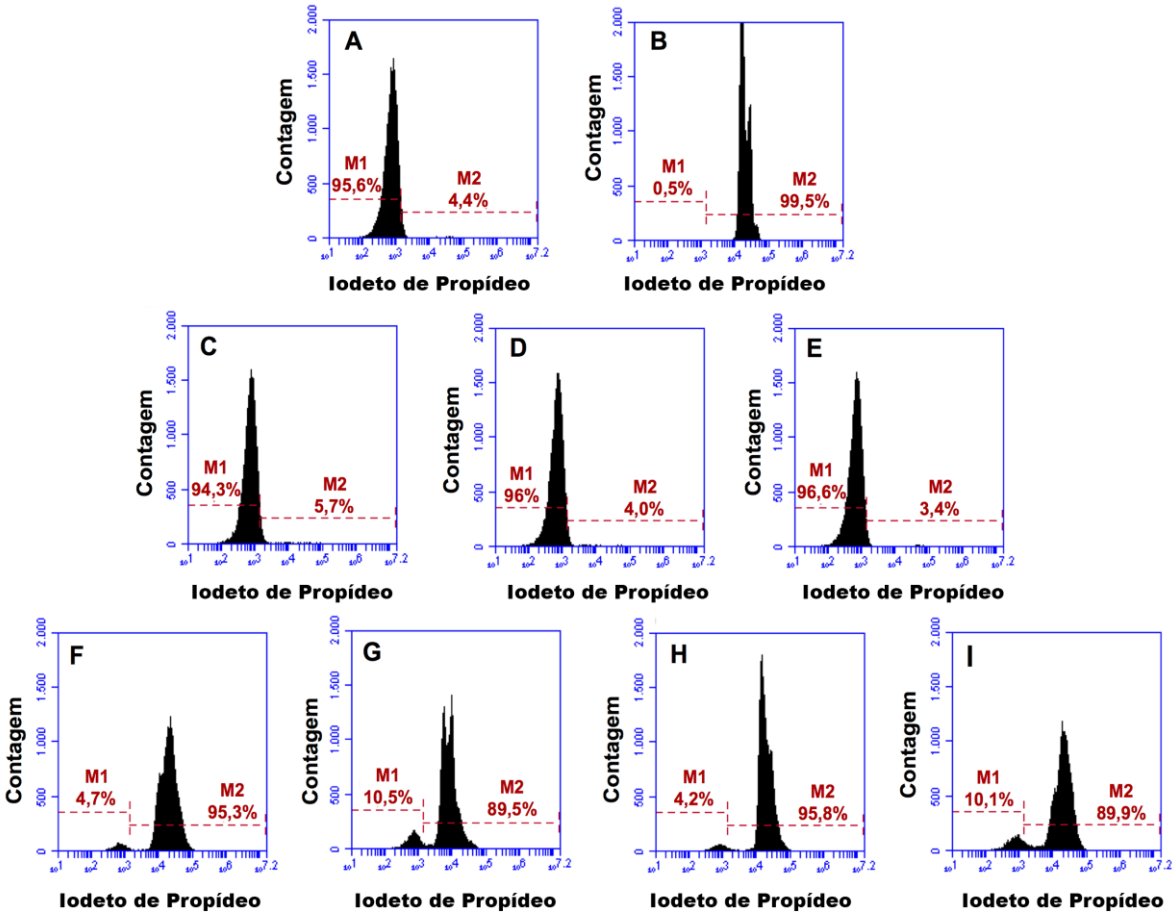


Figura 2 - Histogramas para promastigotas de *L. amazonensis* após tratamento fotodinâmico associado à ZnP hexil, indicando marcação com IP. M1 - células não marcadas; M2 - células marcadas IP positivas. **Legenda**: **A -** IP (controle negativo – sem tratamento); **B -** H_2O_2 (controle positivo); **C** - ZnP 1,25 µM; **D -** Luz 1 (3,4 J/cm^2); **E -** Luz 2 (2,4 J/cm^2); **F -** ZnP 0,62 µM + Luz 1 (**TFD 1**); **G -** ZnP 0,62 µM + Luz 2 (**TFD 2**); **H -** ZnP 1,25 µM + Luz 1 (**TFD 3**); **I -** ZnP 1,25 µM + Luz 2 (**TFD 4**).

Trabalhos como o de Aureliano et al. [29] utilizando o AM como FS em várias concentrações de até 250 µM, com exposição irradiante de 265,4 J/cm², alcançaram uma marcação considerável de 73% a 87% com o IP. Mesmo aplicando concentrações e tempos de irradiação menores, neste presente estudo, foram observadas marcações ainda maiores. Adicionalmente, quando comparado a ZnP etil, que apresentou marcação por volta de 50%, nota-se que o aumento da cadeia alifática da porfirina induziu maior dano à membrana plasmática, provavelmente devido ao maior caráter anfifílico da ZnP hexil, o que contribuiu para o aumento da eficiência [15, 32].

Essas fatos também foram observados no estudo de Pavani et al. [18] no qual os autores discutiram que a TFD mediada por porfirinas que apresentam longas cadeias alquílicas geravam indicadores de morte celular em células de câncer maiores do que as porfirinas que apresentavam grupos metílicos associados ao seu anel porfirínico [33], sendo

que estes indicadores foram ainda um pouco maiores para os compostos quelados com zinco, Zn(II). Moghnie et al. [34] também observaram um maior dano na membrana plasmática de leveduras *Saccharomyces cerevisiae* na TFD mediada por ZnTnHex-2-PyP^{4+}, em comparação com análogos mais hidrofílicos.

3.1.3 – Efeito do Tratamento Fotodinâmico no Potencial de Membrana Mitocondrial

A Rh 123 é uma sonda fluorescente capaz de se acumular dentro da membrana mitocondrial polarizada de uma célula fisiologicamente normal, gerando assim fluorescência. A diminuição da fluorescência da Rh 123 indica a despolarização da membrana mitocondrial enquanto o aumento indica hiperpolarização [28]. Todas as amostras de promastigotas tratadas fotodinamicamente demonstraram relevantes alterações mitocondriais, de acordo com a análise por citometria de fluxo. Os resultados das alterações mitocondriais estão apresentados na **Figura 3**.

Foi observada uma discreta hiperpolarização analisando-se a mediana de intensidade de fluorescência (MIF) e o IV para as células tratadas apenas com a ZnP hexil (no escuro) ou com luz, independentemente da exposição irradiante utilizada. Já nas amostras fotodinamicamente tratadas, a MIF apresentou uma intensa diminuição, maior que 75% (Figura 3A), e valores de IV negativos foram observados (Figura 3B), indicando despolarização da membrana mitocondrial do parasita. Dados semelhantes foram obtidos para o controle positivo com H_2O_2. Dessa forma, os dados da Rh 123 indicam que houve alteração no $\Delta\Psi M$ e consequentemente danos na mitocôndria do parasita, induzidos pela TFD.

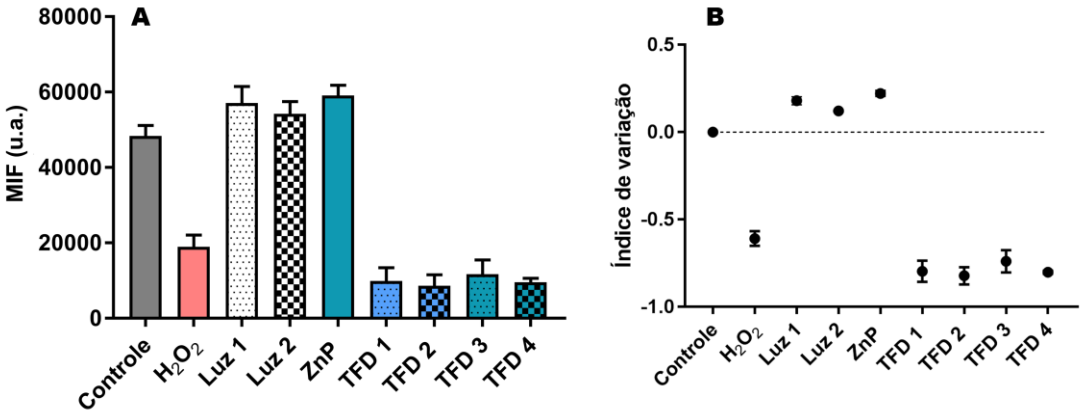


Figura 3 - Avaliação por citometria de fluxo de alterações no potencial mitocondrial em promastigotas de *L. amazonensis*, submetidas ao efeito fotodinâmico associado à ZnP hexil. **Legenda**: **A -** MIF da Rh 123; **B -** Índice de variação. **ZnP -** 1,25 µM; **Luz 1** (3,4 J/cm^2); **Luz 2** (2,4 J/cm^2); **TFD 1 -** ZnP 0,62 µM + Luz 1; **TFD 2 -** ZnP 0,62 µM + Luz 2; **TFD 3 -** ZnP 1,25 µM + Luz 1; **TFD 4 -** ZnP 1,25 µM + Luz 2.

Esta diminuição na MIF da Rh 123 (**Figura 3**) sugere um aumento na permeabilidade aos prótons através da membrana mitocondrial interna, o que acarreta na diminuição parcial ou completa da síntese de ATP e, consequentemente, morte do parasito. Este fato torna-se mais crucial para organismos como os do gênero *Leishmania*, que apresentam uma única mitocôndria, portanto, não têm possibilidade de compensar mitocôndrias danificadas como ocorre nos organismos eucariotos. Desta maneira, a sobrevivência do parasito necessita do correto desempenho desta organela [35].

Andrade et al. [15] também observaram uma discreta hiperpolarização da membrana mitocondrial nas amostras tratadas apenas com luz. Por outro lado, nas amostras tratadas fotodinamicamente com a ZnP etil, diferentemente da ZnP hexil, foi observado um aumento no IV. No estudo foi atribuído que este aumento estaria associado a uma tentativa final das células de impedir a morte, já que a despolarização mitocondrial é precedida por uma hiperpolarização transitória [36], no entanto, mais estudos seriam necessários para elucidar essa questão.

A intensa despolarização observada para a ZnP hexil, quando comparada à ZnP etil, pode estar relacionada a sua maior biodisponibilidade intracelular. Estudos como o de Bacellar et al. [37], por exemplo, provaram uma maior eficiência para FSs anfifílicos em sistemas miméticos de membrana. Uma vez que a ação das EROs se limita ao seu local de acumulação, o FS precisa estar muito próximo para ocorrer a oxidação de biomoléculas, como os lipídios da membrana [38].

Além disso, Benov, Craik e Batinic-Haberle [19] relataram que, de acordo com estudos realizados com células de mamíferos, a ZnP etil tende a se acumular preferencialmente nos lisossomos e/ou apresenta-se distribuída de forma difusa no citoplasma. Já a ZnP hexil, devido a sua maior lipofilicidade, é retida pelas células, utilizando-se uma concentração bem menor. Estudos também apontam que a ZnP hexil tem uma alta afinidade pela mitocôndria, retículo endoplasmático e membrana plasmática em células de mamíferos [17,32]. Assim, esses pontos podem ajudar a justificar as diferenças encontradas no $\Delta\Psi M$ para a ZnP hexil e a ZnP etil nas formas promastigotas de *Leishmania*.

Os dados obtidos nas análises de IP, potencial mitocondrial e contagem por azul de tripan para *L. braziliensis* seguiriam o mesmo perfil apresentado para *L. amazonensis* e encontram-se no Material Suplementar (Figuras **S1, S2 e S3**).

3.2 - Marcação Celular das Formas Promastigotas com a ZnP Hexil

Na **Figura 4**, observa-se a fluorescência da ZnP hexil após interação com formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados revelaram uma intensa marcação da ZnP hexil, predominantemente acumulada em forma de agregados distribuídos ao longo do citoplasma do parasito, demonstrando uma ampla absorção do FS pelos parasitos. Os resultados de ΔΨM sugerem que essa fluorescência poderia corresponder ao acúmulo da ZnP hexil ao longo da mitocôndria ou em regiões próximas a ela.

Os ensaios indicaram que não houve diferença no perfil de marcação após 5 ou 15 min de incubação, indicando também que o tempo adotado para incubação nos ensaios fotodinâmicos já era suficiente para marcar eficientemente as células. Não foi observada fluorescência proveniente dos flagelos.

A captação do FS e sua localização celular são informações relevantes para uma aplicação bem sucedida da TFD. Diferentes estudos vêm utilizando a microscopia de fluorescência para analisar a captação de FSs por promastigotas do gênero *Leishmania* [23, 24, 26, 42]. Padrões distintos dos observados aqui para a ZnP hexil foram reportados. Ensaios com clorina e6 e AM indicaram acumulação do FS no citoplasma [23, 24]. Já em análises com curcumina, o núcleo apresentou marcação mais intensa [25]. Essas caracterizações citadas anteriormente foram realizadas com 1 h de incubação. No presente estudo, 5 min de incubação com a ZnP hexil já foi suficiente para visualizar o padrão em forma de agregados de marcação.

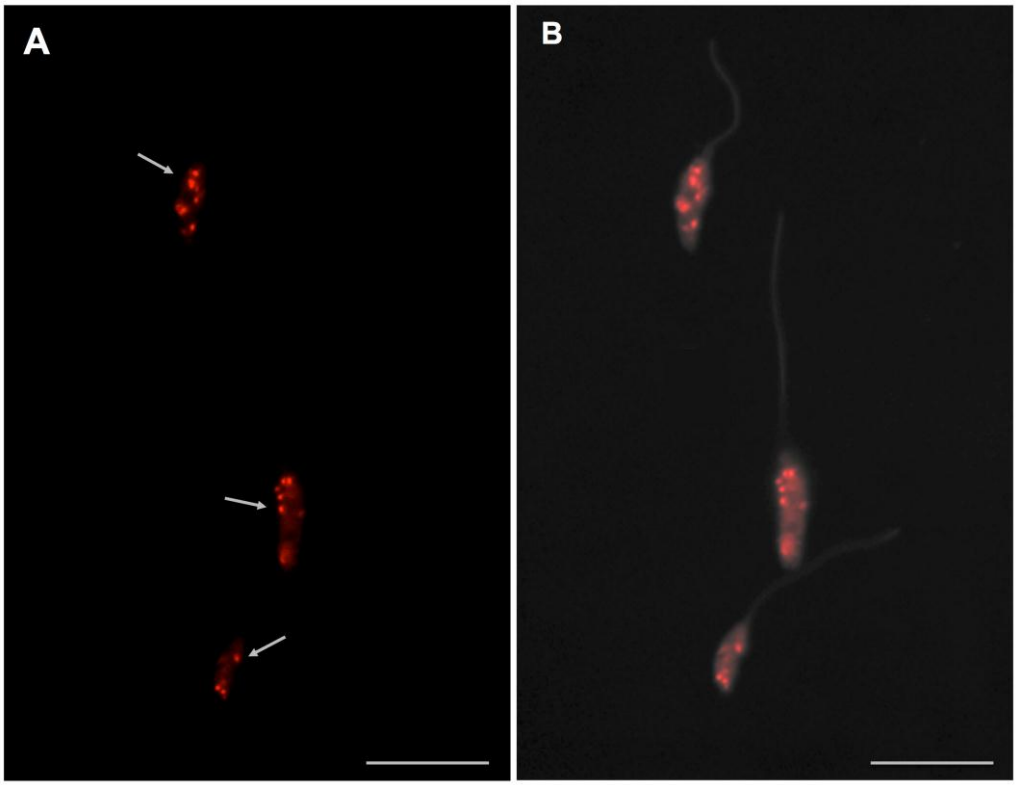


Figura 4 - Imagem de microscopia de fluorescência confocal de promastigotas de *L. amazonensis*. **A -** Marcação pela ZnP hexil (5µM) da *L. amazonensis* após incubação por 15 min (em vermelho). **B -** Os parâmetros foram acentuados para relevar a autofluorescência da célula em cinza. Observa-se um padrão predominantemente em forma de agregados (setas) pela ZnP hexil ao longo do citoplasma do parasita. Barra de escala: 10 µm.

3.3 - Análise Morfológica das Formas promastigotas

A observação morfológica através de MEV demonstrou que as formas promastigotas de *L. amazonensis* do grupo controle (não tratadas) e do grupo Luz 1 mantiveram suas características morfológicas, tais como: corpo alongado e fusiforme, membrana e flagelo bem conservados (Figuras 5A e 5B). As células tratadas apenas com a ZnP hexil 1,25 µM (Figura 5C) também não apresentaram alterações consideráveis em sua morfologia.

No entanto, os parasitas submetidos ao tratamento fotodinâmico apresentaram alterações como diminuição do comprimento do corpo celular e membrana plasmática com aspecto rugoso, o que pode indicar desequilíbrio osmótico e alterações de permeabilidade corroborando com os resultados da marcação do IP e do azul de tripan. Além disso, as células também apresentaram alterações morfológicas no flagelo, como destacamento da membrana flagelar (seta vermelha) e ruptura do mesmo (seta branca) (Figuras 5D e 5E). Esta modificação no corpo celular pode também indicar perda da integridade do citoesqueleto [39].

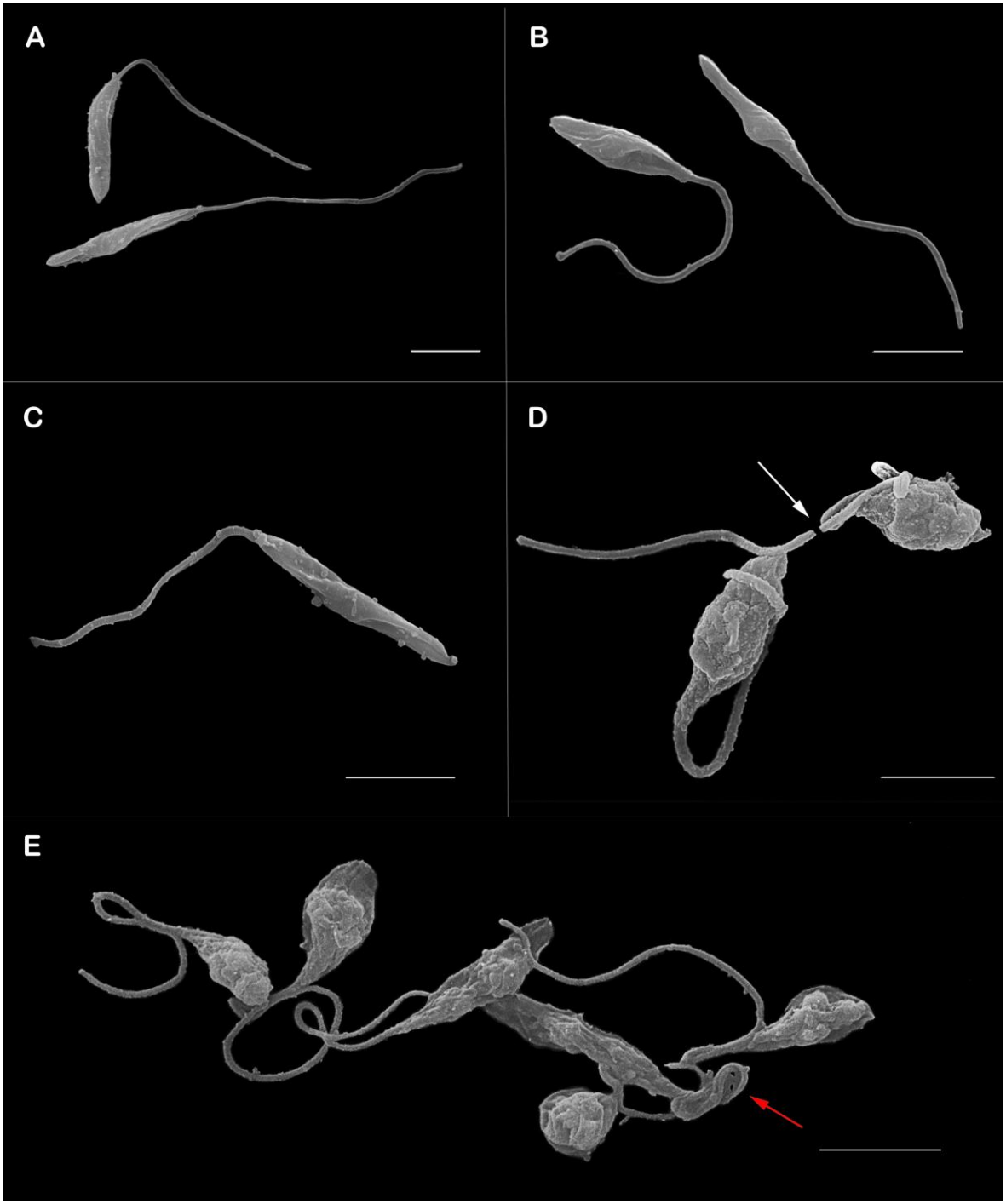


Figura 5 - Efeito fotodinâmico sobre a morfologia de promastigotas de *L. amazonensis* observado através da microscopia eletrônica de varredura. **Legenda**: **A -** Controle (sem tratamento); **B -** Luz 1 (3,4 J/cm^2); **C -** ZnP hexil 1,25 μM; **D -** ZnP 1,25 μM + Luz 1 (TFD 1); **E -** ZnP 0,62 μM + Luz 1 (TFD 3). Seta branca indica ruptura do flagelo celular e seta vermelha um destacamento da membrana flagelar. Barra de escala 5 μm.

Alterações na membrana celular do parasito podem ser explicadas pelo fato das EROs formadas promoverem reações oxidativas na membrana plasmática, acometendo proteínas e lipídios. A presença de lipídios insaturados oxidados, por exemplo, pode afetar as propriedades biofísicas da membrana, como sua permeabilidade e organização [40].

Akilov et al. [41], assim como outros autores [23, 24], utilizando diferentes classes de FSs, também observaram por microscopia óptica modificações semelhantes às relatadas no presente estudo em formas promastigotas de *Leishmania*. Os autores também relataram transições do perfil alongado e fusiforme do parasita para uma forma arredondada. Caracterizações por MEV, após o tratamento fotodinâmico utilizando a ZnP etil, também indicaram modificações morfológicas semelhantes a desse estudo em formas promastigotas de *L. braziliensis* [15].

3.4 - Citotoxicidade em Células de Mamíferos

Optou-se por conduzir os testes para avaliar o efeito fotodinâmico sobre os macrófagos nas condições de maior exposição irradiante (TFD 1 e TFD 3). Como mostrado na **Figura 6**, observa-se que no grupo tratado apenas com a ZnP 1,25 μM no escuro, não houve alterações consideráveis na viabilidade dos macrófagos. Os resultados mostraram também que as células irradiadas somente pela luz (Luz 1) sofreram um aumento da viabilidade celular de cerca de 35%. Já é conhecido que a irradiação pela luz azul pode exercer efeitos regulatórios na proliferação e diferenciação de certos tipos de células de mamíferos [43, 44].

Vale ainda ressaltar que, apesar das culturas primárias serem em geral mais sensíveis quando comparadas aos macrófagos de linhagem [45], as amostras fotodinamicamente tratadas pela ZnP hexil 0,62 e 1,25 μM apresentaram viabilidade superior a 80%. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre o tratamento fotodinâmico com ZnP hexil nas concentrações de 0,62 e 1,25 μM.

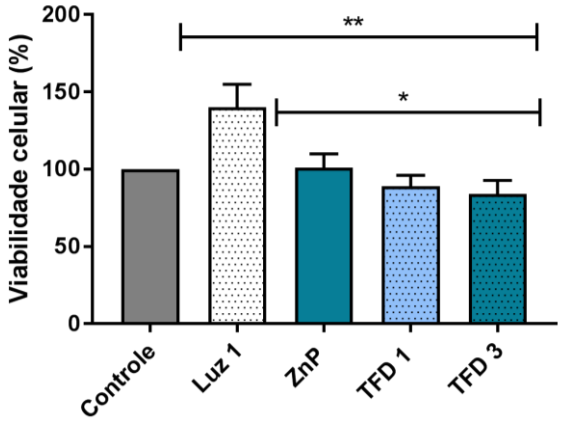


Figura 6 - Viabilidade celular de macrófagos medulares, avaliada imediatamente após tratamento fotodinâmico associado à ZnP hexil. **Legenda**: **ZnP -** 1,25 μM; **Luz 1 -** 3,4 J/cm^2; **TFD 1 -** ZnP 0,62 μM + Luz 1; **TFD 3 -** ZnP 1,25 μM + Luz 1. Observações: grupos estatisticamente significantes ($p < 0,05$) quando comparados ao controle (**) e ao tratamento só com luz (*).

Andrade et al. [15] utilizando a ZnP etil na concentração de 10 μM e dose de 90 J/cm², observaram um decréscimo de *ca*. 50% em macrófagos de camundongos BALB/c provenientes de cultura primária. Bristow et al. [46] utilizaram quatro tipos de porfirinas catiônicas, duas contendo grupos fosfônios e duas modificadas com grupos contendo nitrogênio, ambas associadas a TFD (80 J/cm^2) sobre a *L. major*. A maioria dos FSs foi eficaz contra o parasito, porém três deles nas concentrações de 3,95, 3,76 e 0,91 μM, foram capazes de diminuir a viabilidade de macrófagos humanos U937 em 50%. Outros FSs, como, por exemplo, os derivados do corante rosa bengala, apresentaram alta atividade leishmanicida, porém, também apresentaram toxicidade sobre macrófagos de camundongo J774, mesmo no escuro [47]. Dessa forma, os resultados de citotoxicidade obtidos no presente trabalho foram promissores.

A citotoxicidade frente a células de mamíferos é um fator relevante visando futuras aplicações *in vivo*. As células de mamíferos, como os macrófagos, apresentam defesas antioxidantes mais eficazes em relação ao tratamento fotodinâmico quando comparadas aos parasitas do gênero *Leishmania*, pois apresentam a atividade da catalase e a glutationa peroxidase, que estão ausentes nos parasitas do gênero *Leishmania*. Isto torna essas células mais resistentes e os parasitas mais susceptíveis à produção de EROs [48].

Vale ainda salientar que a aplicação localizada proporcionada pela TFD associada à utilização de menores concentrações de FS – uma vez que a quantidade do FS acumulado na célula é um fator limitante para a fotocitotoxicidade [34] – e ao uso de menores exposições irradiantes [49] é relevante para a seletividade do fotodano desejado.

3.5 - Efeito Fotodinâmico nas Formas Amastigotas

A infecção dos macrófagos resultou em um número médio de 6,5 amastigotas por macrófago, com uma taxa de infecção de cerca de 90%. A **Figura 7** ilustra o efeito fotodinâmico associado à ZnP hexil nos macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Não houve diferenças significativas entre os grupos controle, ZnP e Luz 1. Porém, nos grupos tratados fotodinamicamente, houve um decréscimo de aproximadamente 50% no número de amastigotas quando utilizada ZnP a 0,62 μM e próximo de 60% para ZnP a 1,25 μM. A **Figura 8** ilustra a redução do número de amastigotas nos macrófagos infectados após o tratamento fotodinâmico com a ZnP hexil (Figura 8B) em comparação aos não tratados (Figura 8A).

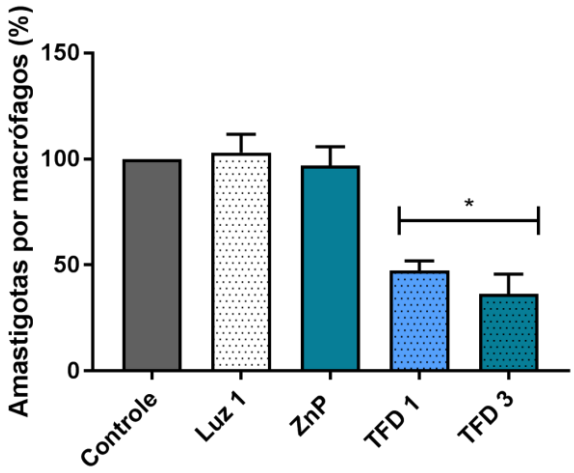


Figura 7 - Porcentagem total de amastigotas de *L. amazonensis* por macrófagos imediatamente após o tratamento fotodinâmico associado a ZnP hexil. **Legenda: Luz 1 -** 3,4 J/cm^2; **TFD 1 -** ZnP 0,62 µM + Luz 1; **TFD 3 -** ZnP 1,25 µM + Luz 1. Observações: grupos estatisticamente significantes (p <0,05) quando comparados ao controle **(*)**.

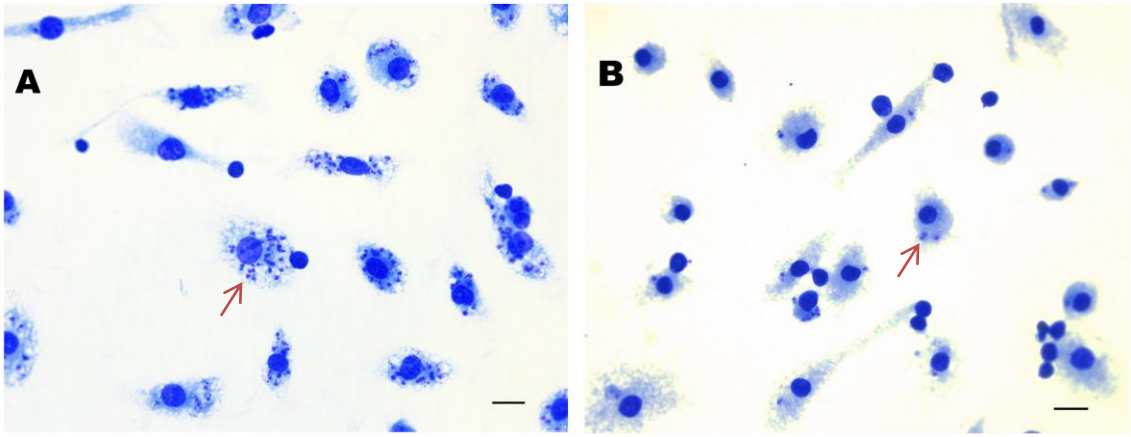


Figura 8 - Imagens de microscopia óptica de macrófagos corados por coloração panótica. **A -** Macrófagos infectados não tratados. **B -** Macrófagos infectados, após o tratamento fotodinâmico (TFD 1 - ZnP 0,62 µM + Luz 1). Barra de escala: 10 µm. Setas vermelhas indicam formas amastigotas.

O estudo realizado com a ZnP etil [15] mostrou uma redução de 40% do número de amastigotas utilizando uma maior concentração (10 µM). Dessa forma, os resultados obtidos no atual estudo sugerem uma eficiência superior da ZnP hexil como FS, apesar do tempo de incubação com a célula, exposição irradiante e concentrações menores quando comparados com a literatura [23, 25, 50], obteve-se resultados tão promissores quanto ou superiores.

Outro estudo [51] utilizando o ácido δ-aminolevulínico (ALA) não mostrou efeitos leishmanicidas em amastigotas de *L. major in vitro*, porém, apresentou redução da carga parasitária *in vivo*, concluindo que possivelmente esse efeito antiparasitário do ALA se dá indiretamente através da morte das células hospedeiras [51, 52]. Assim, novos FSs têm sido

desenvolvidos na busca de compostos mais eficientes, que possam dar respostas mais rápidas, seletivas e efetivas *in vivo*, e a ZnTnHex-2-PyP^{4+} se mostrou um forte candidato a ser utilizado para esta finalidade.

4 - CONCLUSÃO

O tratamento fotodinâmico mediado pela ZnTnHex-2-PyP^{4+} apresentou eficiência nas condições analisadas, mesmo utilizando uma baixa concentração de FS, se mostrando promissor e estimulando a realização de ensaios *in vivo* voltados para a LC. Estes resultados também encorajam mais estudos relacionados à compreensão da ação e efeitos associados à inativação fotodinâmica microbiana, mediada por porfirinas de Zn(II).

CONFLITO DE INTERESSE

Não há conflitos a declarar.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Instituto Aggeu Magalhães – Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ), especificamente ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas, a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), à Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Esse estudo está associado ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fotônica (INFo).

REFERÊNCIAS

[1] WHO – World Healthy Organization. *Leishmaniasis*. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>. Acesso em: 2018.

[2] Torres-Guerrero, E., Quintanilla-Cedillo, M. R., Ruiz-Esmenjaud, J., & Arenas, R. (2017). Leishmaniasis: a review. *F1000Research*, *6*.

[3] Bailey, F., Mondragon-Shem, K., Haines, L. R., Olabi, A., Alorfi, A., Ruiz-Postigo, J. A., & Al-Salem, W. (2019). Cutaneous leishmaniasis and co-morbid major depressive disorder: A systematic review with burden estimates. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *13*(2), e0007092.

[4] Santos, I. B., da Silva, D. A., Paz, F. A., Garcia, D. M., Carmona, A. K., Teixeira, D., ... & Barbiéri, C. L. (2018). Leishmanicidal and immunomodulatory activities of the

Palladacycle complex DPPE 1.1, a potential candidate for treatment of cutaneous Leishmaniasis. *Frontiers in Microbiology*, *9*, 1427.

[5] Johansen, M. B., Jemec, G. B., & Fabricius, S. (2019). Effective treatment with photodynamic therapy of cutaneous leishmaniasis: A case report. *Dermatologic therapy*, *32*(5), e13022.

[6] Siqueira, L. B. D. O., da Silva Cardoso, V., Rodrigues, I. A., Vazquez-Villa, A. L., Dos Santos, E. P., Guimarães, B. D. C. L. R., ... & Junior, E. R. (2017). Development and evaluation of zinc phthalocyanine nanoemulsions for use in photodynamic therapy for Leishmania spp. *Nanotechnology*, *28*(6), 065101.

[7] Santos, A. F., de Almeida, D. R. Q., Terra, L. F., Wailemann, R. A., Gomes, V. M., Arini, G. S., ... & Labriola, L. (2019). Fluence Rate Determines PDT Efficiency in Breast Cancer Cells Displaying Different GSH Levels. *Photochemistry and photobiology*.

[8] Freitas, L. M., & Baptista, M. S. (2019, August). Antimicrobial PDT in South America. In *17th International Photodynamic Association World Congress* (Vol. 11070, p. 110708L). International Society for Optics and Photonics.

[9] Goto, H., & Lindoso, J. A. L. (2010). Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert review of anti-infective therapy*, *8*(4), 419-433.

[10] Sabino, C. P., Wainwright, M., dos Anjos, C., Sellera, F. P., Baptista, M. S., Lincopan, N., & Ribeiro, M. S. (2019). Inactivation kinetics and lethal dose analysis of antimicrobial blue light and photodynamic therapy. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, *28*, 186-191.

[11] Asilian, A., & Davami, M. (2006). Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *Clinical and Experimental Dermatology: Clinical dermatology*, *31*(5), 634-637.

[12] Baglo, Y., Liang, B. J., Robey, R. W., Ambudkar, S. V., Gottesman, M. M., & Huang, H. C. (2019). Porphyrin-lipid assemblies and nanovesicles overcome ABC transporter-mediated photodynamic therapy resistance in cancer cells. *Cancer letters*, *457*, 110-118.

[13] Cai, Q., Yang, L. J., Chen, J., Yang, H., Gao, Z. Q., & Wang, X. L. (2018). Successful Sequential Treatment with Itraconazole and ALA-PDT for Cutaneous Granuloma by

Candida albicans: A Case Report and Literature Review. *Mycopathologia*, *183*(5), 829-834.

[14] Shitomi, K., Miyaji, H., Miyata, S., Sugaya, T., Ushijima, N., Akasaka, T., & Kawasaki, H. (2020). Photodynamic inactivation of oral bacteria with silver nanoclusters/rose bengal nanocomposite. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 101647.

[15] Andrade, C. G., Figueiredo, R. C. B. Q., Ribeiro, K. R. C., Souza, L. I. O., Sarmento-Neto, J. F., Rebouças, J. S., ... & Fontes, A. (2018). Photodynamic effect of zinc porphyrin on the promastigote and amastigote forms of Leishmania braziliensis. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *17*(4), 482-490.

[16] Pan, D., Zhong, X., Zhao, W., Yu, Z., Yang, Z., Wang, D., ... & He, W. (2018). Meso-substituted porphyrin photosensitizers with enhanced near-infrared absorption: Synthesis, characterization and biological evaluation for photodynamic therapy. *Tetrahedron*, *74*(21), 2677-2683.

[17] Ezzeddine, R., Al-Banaw, A., Tovmasyan, A., Craik, J. D., Batinic-Haberle, I., & Benov, L. T. (2013). Effect of molecular characteristics on cellular uptake, subcellular localization, and phototoxicity of Zn (II) N-alkylpyridylporphyrins. *Journal of Biological Chemistry*, *288*(51), 36579-36588.

[18] Pavani, C., Iamamoto, Y., & Baptista, M. S. (2012). Mechanism and efficiency of cell death of type II photosensitizers: Effect of zinc chelation. *Photochemistry and photobiology*, *88*(4), 774-781.

[19] Benov, L., Craik, J., & Batinic-Haberle, I. (2011). The potential of Zn (II) N-alkylpyridylporphyrins for anticancer therapy. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)*, *11*(2), 233-241.

[20] Viana, O. S., Ribeiro, M. S., Rodas, A. C., Rebouças, J. S., Fontes, A., & Santos, B. S. (2015). 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*, 20(5), 8893-8912.

[21] Strober, W. (2015). Trypan blue exclusion test of cell viability. *Current protocols in immunology*, *111*(1), A3-B.

[22] Aliança, A. S. D. S., Anjos, K. F. L. D., de Vasconcelos Reis, T. N., Higino, T. M. M., Brelaz-de-Castro, M. C. A., Bianco, É. M., & De Figueiredo, R. C. B. Q. (2014). The

in vitro biological activity of the Brazilian brown seaweed Dictyota mertensii against Leishmania amazonensis. *Molecules*, *19*(9), 14052-14065.

[23] Pinto, J. G., Pereira, A. H. C., de Oliveira, M. A., Kurachi, C., Raniero, L. J., & Ferreira-Strixino, J. (2016). Chlorin E6 phototoxicity in L. major and L. braziliensis promastigotes—In vitro study. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, *15*, 19-24.

[24] Pinto, J. G., de Souza Martins, J. F., Pereira, A. H. C., Mittmann, J., Raniero, L. J., & Ferreira-Strixino, J. (2017). Evaluation of methylene blue as photosensitizer in promastigotes of Leishmania major and Leishmania braziliensis. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, *18*, 325-330.

[25] Song, D., Lindoso, J. A. L., Oyafuso, L. K., Kanashiro, E. H. Y., Cardoso, J. L., Uchoa, A. F., ... & Baptista, M. S. (2011). Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. *Photomedicine and laser surgery*, *29*(10), 711-715.

[26] Pinto, J. G., Fontana, L. C., de Oliveira, M. A., Kurachi, C., Raniero, L. J., & Ferreira-Strixino, J. (2016). In vitro evaluation of photodynamic therapy using curcumin on Leishmania major and Leishmania braziliensis. *Lasers in medical science*, *31*(5), 883-890.

[27] Cabra, F. V., Sabino, C. P., Dimmer, J. A., Sauter, I. P., Cortez, M. J., & Ribeiro, M. S. (2019). Preclinical Investigation of Methylene Blue-mediated Antimicrobial Photodynamic Therapy on Leishmania Parasites Using Real Time Bioluminescence. *Photochemistry and Photobiology*.

[28] Scariot, D. B., Britta, E. A., Moreira, A. L., Falzirolli, H., Silva, C. C., Ueda-Nakamura, T., ... & Nakamura, C. V. (2017). Induction of early autophagic process on Leishmania amazonensis by synergistic effect of miltefosine and innovative semi-synthetic thiosemicarbazone. *Frontiers in microbiology*, *8*, 255.

[29] Aureliano, D. P., Lindoso, J. A. L., de Castro Soares, S. R., Takakura, C. F. H., Pereira, T. M., & Ribeiro, M. S. (2018). Cell death mechanisms in Leishmania amazonensis triggered by methylene blue-mediated antiparasitic photodynamic therapy. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, *23*, 1-8.

[30] Yamamoto, E. S., Campos, B. L., Jesus, J. A., Laurenti, M. D., Ribeiro, S. P., Kallas, E. G., ... & Lago, J. H. (2015). The effect of ursolic acid on Leishmania (Leishmania) amazonensis is related to programed cell death and presents therapeutic potential in experimental cutaneous leishmaniasis. *PLoS One*, *10*(12).

[31] Doroodgar, M., Delavari, M., Doroodgar, M., Abbasi, A., Taherian, A. A., & Doroodgar, A. (2016). Tamoxifen induces apoptosis of Leishmania major promastigotes in vitro. *The Korean journal of parasitology*, *54*(1), 9.

[32] Odeh, A. M., Craik, J. D., Ezzeddine, R., Tovmasyan, A., Batinic-Haberle, I., & Benov, L. T. (2014). Targeting mitochondria by Zn (II) N-alkylpyridylporphyrins: the impact of compound sub-mitochondrial partition on cell respiration and overall photodynamic efficacy. *PLoS One*, *9*(9).

[33] Benov, L., Craik, J., & Batinic-Haberle, I. (2012). Protein damage by photo-activated Zn (II) N-alkylpyridylporphyrins. *Amino acids*, *42*(1), 117-128.

[34] Moghnie, S., Tovmasyan, A., Craik, J., Batinic-Haberle, I., & Benov, L. (2017). Cationic amphiphilic Zn-porphyrin with high antifungal photodynamic potency. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *16*(11), 1709-1716.

[35] Garcia, F. P., da Silva Rodrigues, J. H., Din, Z. U., Rodrigues-Filho, E., Ueda-Nakamura, T., Auzély-Velty, R., & Nakamura, C. V. (2017). A3K2A3-induced apoptotic cell death of Leishmania amazonensis occurs through caspase-and ATP-dependent mitochondrial dysfunction. *Apoptosis*, *22*(1), 57-71.

[36] Mehta, A., & Shaha, C. (2004). Apoptotic death in Leishmania donovani promastigotes in response to respiratory chain inhibition complex II inhibition results in increased Pentamidine cytotoxicity. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(12), 11798-11813.

[37] Bacellar, I. O., Oliveira, M. C., Dantas, L. S., Costa, E. B., Junqueira, H. C., Martins, W. K., ... & Miotto, R. (2018). Photosensitized membrane permeabilization requires contact-dependent reactions between photosensitizer and lipids. *Journal of the American Chemical Society*, *140*(30), 9606-9615.

[38] Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., ... & Kulbacka, J. (2018). Photodynamic therapy–mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *106*, 1098-1107.

[39] Jiménez-Ruiz, A., Alzate, J. F., MacLeod, E. T., Lüder, C. G. K., Fasel, N., & Hurd, H. (2010). Apoptotic markers in protozoan parasites. *Parasites & vectors*, *3*(1), 104.

[40] Schmidt, T. F., Caseli, L., Oliveira Jr, O. N., & Itri, R. (2015). Binding of methylene blue onto Langmuir monolayers representing cell membranes may explain its efficiency as photosensitizer in photodynamic therapy. *Langmuir*, *31*(14), 4205-4212.

[41] Akilov, O. E., Kosaka, S., O'Riordan, K., Song, X., Sherwood, M., Flotte, T. J., ... & Hasan, T. (2006). The role of photosensitizer molecular charge and structure on the

efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites. *Chemistry & biology*, *13*(8), 839-847.

[42] Aureliano, D. P., Ribeiro, M. S., Lindoso, J. A. L., Pogliani, F. C., Sellera, F. P., Song, D., & Baptista, M. S. (2014). Treatment and control of leishmaniasis using photodynamic therapy. In *Leishmaniasis-Trends in Epidemiology, Diagnosis and Treatment*. IntechOpen.

[43] Liebmann, J., Born, M., & Kolb-Bachofen, V. (2010). Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *Journal of Investigative Dermatology*, *130*(1), 259-269.

[44] Mamalis, A., Garcha, M., & Jagdeo, J. (2015). Light emitting diode-generated blue light modulates fibrosis characteristics: Fibroblast proliferation, migration speed, and reactive oxygen species generation. *Lasers in surgery and medicine*, *47*(2), 210-215.

[45] Bourdeau, P., Sommers, E., Mark Richardson, G., & Hickman, J. R. (1990). *Short-term toxicity tests for non-genotoxic effects*. Chichester: Wiley.

[46] Bristow, C. A., Hudson, R., Paget, T. A., & Boyle, R. W. (2006). Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis. *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, *3*(3), 162-167.

[47] Navasconi, T. R., dos Reis, V. N., Freitas, C. F., de Souza Pereira, P. C., Caetano, W., Hioka, N., ... & Silveira, T. G. V. (2017). Photodynamic therapy with Bengal Rose and derivatives against Leishmania amazonensis. *Journal of lasers in medical sciences*, *8*(1), 46.

[48] Enk, C. D., Fritsch, C., Jonas, F., Nasereddin, A., Ingber, A., Jaffe, C. L., & Ruzicka, T. (2003). Treatment of cutaneous leishmaniasis with photodynamic therapy. *Archives of dermatology*, *139*(4), 432-434.

[49] König, K., Meyer, H., Schneckenburger, H., & Rück, A. (1993). The study of endogenous porphyrins in human skin and their potential for photodynamic therapy by laser induced fluorescence spectroscopy. *Lasers in medical science*, *8*(2), 127.

[50] Gardner, D. M., Taylor, V. M., Cedeño, D. L., Padhee, S., Robledo, S. M., Jones, M. A., ... & Vélez, I. D. (2010). Association of acenaphthoporphyrins with liposomes for the photodynamic treatment of leishmaniasis. *Photochemistry and photobiology*, *86*(3), 645-652.

[51] Akilov, O. E., Kosaka, S., O'Riordan, K., & Hasan, T. (2007). Parasiticidal effect of δ-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is

indirect and mediated through the killing of the host cells. *Experimental dermatology*, *16*(8), 651-660.

[52] Kosaka, S. (2007). A mechanistic study of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol*, *127*, 1546-1549.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Avaliação *in vitro* do Efeito Fotodinâmico Associado à ZnTnHex-2-PyP^{4+} para o Tratamento da Leishmaniose Cutânea

T. H. S. Souza[1], C. G. Andrade[2], F. V. Cabral[3], B. S. Santos[4], J. F Sarmento-Neto[5], J. S. Rebouças[5], M. S. Ribeiro[3], R. C. B. Q. Figueiredo[6,#], A. Fontes[1,#,*]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – PPGCB, Recife – PE – Brasil.

[2] Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE – Brasil.

[3] Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Centro de Lasers e Aplicações, São Paulo – SP – Brasil.

[4] Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife – PE – Brasil.

[5] Departamento. de Química, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB – Brasil.

[6] Departamento de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães- Fundação Osvaldo Cruz, Recife – PE – Brasil.

[#]Supervisionaram esse estudo em conjunto.

*__Autor correspondente__: Adriana Fontes, Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brazil. E-mail: adri-fontes@ufpe.br.

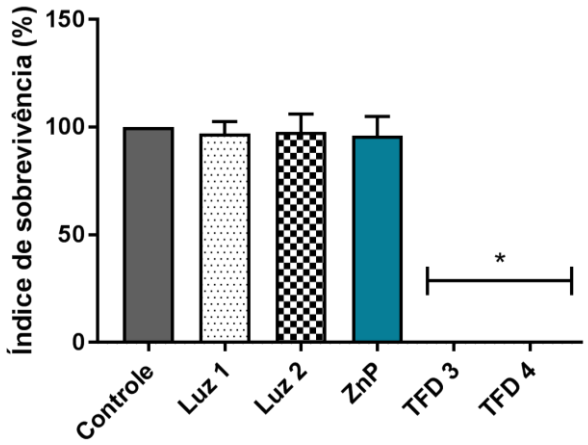


Figura S1 - Sobrevivência de promastigotas de *L. braziliensis* determinada pela contagem celular por azul de tripan, imediatamente após a exposição ao efeito fotodinâmico associado à ZnP. **Legenda: Luz 1 -** Exposição irradiante de *ca.* 3,4 J/cm^2; **Luz 2 -** Exposição irradiante de *ca.* 2,4 J/cm^2; **ZnP -** ZnP 1,25 µM; **TFD 3 -** ZnP 1,25 µM + Luz 1; **TFD 4 -** ZnP 1,25 µM + Luz 2. *Grupos estatisticamente significantes (p <0,05) quando comparados ao controle.

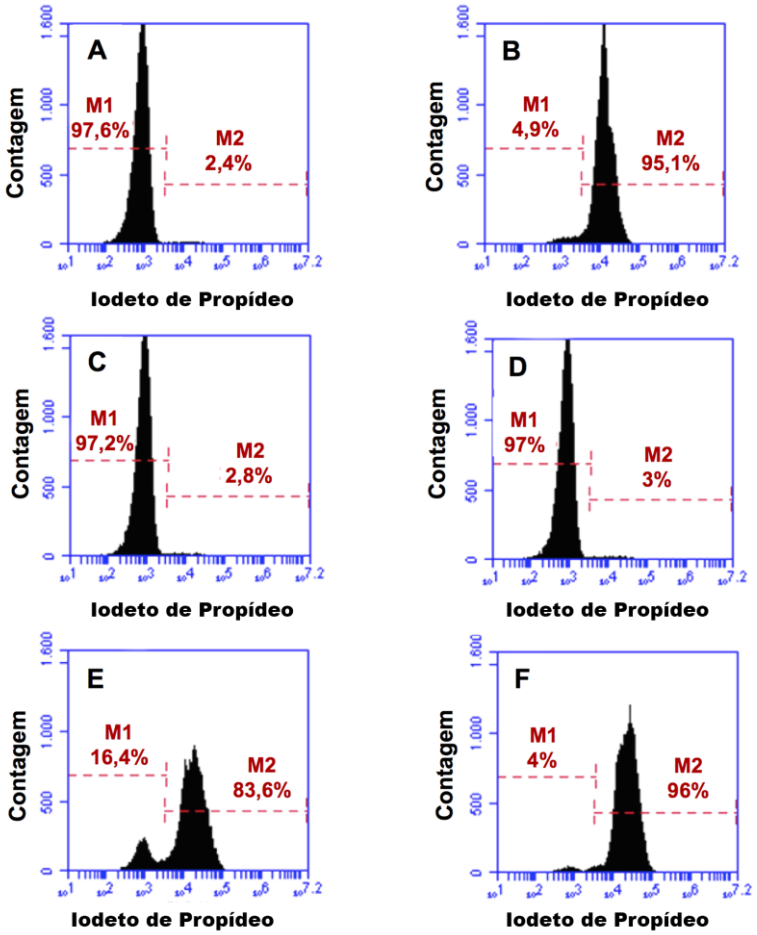


Figura S2 - Histogramas para promastigotas de *L. braziliensis* após tratamento fotodinâmico associado à ZnP hexil, indicando marcação com IP. **M1 -** células não marcadas; **M2** - células marcadas IP positivas. **Legenda**: **A** - IP (controle negativo – sem tratamento); **B -** H_2O_2 (controle positivo); **C -** ZnP 1,25 µM; **D -** Luz 1 (3,4 J/cm^2); **E -** ZnP 0,625 µM + Luz 1 (**TFD 1**); **F -** ZnP 1,25 µM + Luz 1 (**TFD 3**).

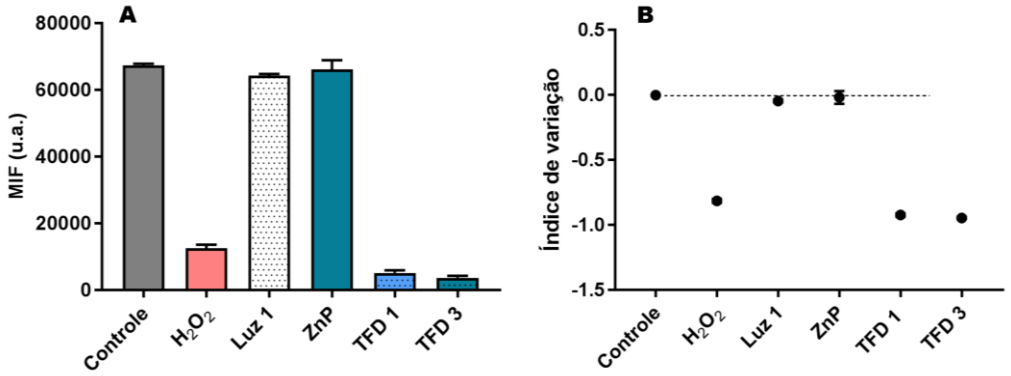


Figura S3 - Avaliação por citometria de fluxo de alterações no potencial mitocondrial em promastigotas de *L. braziliensis*, submetidas ao efeito fotodinâmico associado a ZnP hexil. **Legenda**: **A -** MIF da Rh 123; **B -** Índice de variação. **ZnP -** 1,25 µM; **Luz 1 -** 3,4 J/cm^2; **TFD 1** - ZnP 0,62 µM + Luz 1; **TFD 3** - ZnP 1,25 µM + Luz 1.

6 - CONCLUSÃO

- O tratamento fotodinâmico associado à porfirina ZnTnHex-2-PyP^{4+} resultou em uma drástica redução na viabilidade das formas promastigotas da *L. amazonensis* e *L. braziliensis*;
- Os ensaios com o IP e com o azul de tripan revelaram perda da integridade da membrana plasmática causada pelo tratamento fotodinâmico, culminando na morte dos parasitos;
- O tratamento fotodinâmico também afetou a fisiologia da mitocôndria, diminuindo seu potencial de membrana;
- De acordo com a microscopia eletrônica de varredura, após o tratamento fotodinâmico as células perderam seu formato fusiforme e apresentaram uma diminuição no comprimento do corpo celular e membrana plasmática com aspecto rugoso, correlacionando-se com os resultados de IP e com azul de tripan;
- Tanto a redução acentuada no número de amastigotas, quanto a ausência de citotoxicidade frente a células de mamíferos, após o tratamento fotodinâmico, indicam o potencial para esta ZnP ser aplicada *in vivo*;
- Por fim, este estudo demonstra que o tratamento fotodinâmico mediado pela ZnTnHex-2-PyP^{4+} pode ser promissor no tratamento da LC.

7 - PERSPECTIVAS

As perspectivas para esse trabalho incluem aprimorar as condições de tratamento das formas amastigotas, tais como aumentar o tempo de incubação com a ZnP, além de testar outras condições de avaliação do efeito, como por exemplo, um intervalo de tempo maior entre a aplicação e fixação das amostras. Ainda, planeja-se avaliar o tratamento fotodinâmico mediado pela ZnTnHex-2-PyP^{4+} *in vivo*.

ANEXO A- CARTAS DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Aggeu Magalhães

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Certificado de Aprovação

Certificamos que o projeto intitulado **"AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE PORFIRINAS NA TERAPIA FOTODINÂMICA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA PARA APLICAÇÃO NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE"** protocolado sob nº **121/2017** pelo (a) pesquisador (a) **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 Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz (CEUA/IAM). Na presente versão, este projeto está licenciado e tem validade até 17 de janeiro de 2022 com a finalidade de pesquisa científica. Esses animais são advindos do Biotério de criação do Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE. É responsabilidade do coordenador do projeto notificar à CEUA de quaisquer alterações em relação ao projeto. O coordenador concorda que nenhuma dessas mudanças serão implementadas antes de serem aprovadas pela CEUA/IAM.

Quantitativo de Animais Aprovados	
Espécie/Linhagem/Raça	**Nº de Animais/Peso/Idade/Sexo**
Camundongo isogênico (Balb/C)	200 (20-25gr/ 4 semanas/ machos) e 96 (20-25gr/4 semanas/fêmeas)
Total	**296**

Recife (PE, Brasil), 17 de janeiro de 2018

Dr Lindomar José Pena
Coordenador CEUA/IAM

Lindomar José Pena
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA
Mat. Siape: 1971435
e-mail: Lindomar.pena@cpqam.fiocruz.br
IAM / Fiocruz

Av. Professor Moraes Rego, s/n - Cidade Universitária – Campus da UFPE
Recife - PE - CEP: 50.670-420
Telefone: (81) 2101-2500/2101-2600 Fax: (81) 3453-1911
www.cpqam.fiocruz.br

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **"Estudo dos Mecanismos de Ação da Terapia Fotodinâmica em Associação com Nanopartículas Doadoras de Óxido Nítrico (S-nitroso MSA) in vitro e in vivo no Tratamento de Leishmaniose Cutânea por L.(L) Amazonensis"**, registrada com o nº **189/17** sob a responsabilidade de **Martha Simões Ribeiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/IPEN) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares (IPEN-CNEN/SP), em **27/04/2017**.

Finalidade: Pesquisa Científica ou Ensino	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Junho/2017 a Junho/2021
Espécie/linhagem/raça	Camundongos isogênicos Balb/C (Mus musculus)
Nº de animais	85
Peso/Idade	Balb/C: 85F - ~30 g - 8 semanas
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério do IPEN-CNEN/SP

São Paulo, 2 de maio de 2017.

Patrick Jack Spencer
Vice-coordenador da CEUA-IPEN

IPEN-CNEN/SP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO IPEN
Av. Prof. Lineu Prestes, 2242 - Cidade Universitária - CEP: 05508-000 - São Paulo - SP
Telefones: (011) 3133-9696 – Fax (011) 3133-9709
E-mail: ceuaipen@ipen.br