

EFEITO DA TERAPIA FOTODINÂMICA NA VIABILIDADE DE *Leishmania major* – ENSAIOS *in vitro*

Juliana Guerra Pinto¹, Cibelle Barbosa Lopes², Cristina Pacheco Soares², Josane Mittmann²

¹ Faculdade de Ciências da Saúde, Curso Biomedicina.
Universidade do Vale do Paraíba, Brasil, CEP: 12244-000.
Fone: +55 12 3947 1015, Fax: +55 12 3947 1015/ email: juliguerra_crz@hotmail.com

² Instituto de Pesquisa e desenvolvimento IP&D
Universidade do Vale do Paraíba, Brasil, CEP: 12244-000.
Fone: +55 12 3947 1160/

Resumo: A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida através da picada de insetos hematófagos pertencentes ao gênero *Lutzomyia*. A LTA é uma doença endêmica no Brasil onde ocorrem surtos com alguma frequência. A Terapia Fotodinâmica (TFD) parte do princípio de que a interação da luz, de comprimento de onda adequado, com um composto fotosensibilizante e o oxigênio resultam em espécies reativas de oxigênio, capazes de diminuir a viabilidade celular. O objetivo deste trabalho foi testar *in vitro* o efeito da TFD na viabilidade de *Leishmania major*, utilizando AIPcS₄ como fotosensibilizante. O fotosensibilizante foi adicionado aos parasitas em cultura nas concentrações de 1,0 μM e 10,0 μM, e incubado por um período de uma hora. A aplicação do Laser de comprimento de onda de 790 nm foi realizada nas doses de 5 e 10 J/cm². A viabilidade após o tratamento foi analisada pelos métodos de MTT e por exclusão com o Azul de Trypan. A TFD com 10,0 μM de AIPcS₄ e 5 e 10 J/cm² reduziu a atividade mitocondrial e a viabilidade dos parasitas quando comparado aos grupos controle, e aos demais tratamentos.

Palavras-chave: Usar até 5 palavras chaves

Área do Conhecimento:

Introdução

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa, também conhecida pelos nomes de ferida brava ou úlcera de Bauru. É causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida através da picada de insetos hematófagos pertencentes ao gênero *Lutzomyia* conhecidos popularmente como mosquito-palha.

A *Leishmania* é um protozoário pertencente à família Trypanosomatidae com duas formas principais: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e em alguns meios de cultura artificiais, e outra aflagelada ou amastigota, como é vista nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (homem e outros animais superiores). (Manual de controle, 2000). As formas amastigotas de *Leishmania* são encontradas parasitando células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) do hospedeiro vertebrado, principalmente macrófagos residentes na pele. (Neves, 2005)

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), no Brasil, a Leishmaniose Tegumentar está distribuída em 17 dos 27 estados com maior incidência no Nordeste com 92% do total de casos, seguido pela região Sudeste (4%), a região

Norte (3%), e, finalmente, a região Centro-Oeste (1%). No período de 1985 a 1999, foram registrados no país 388.155 casos autóctones de leishmaniose tegumentar americana. O tratamento convencional é realizado com antimoniais pentavalentes (Sb+5). A OMS recomenda que a dose deste antimonial seja calculada em mg Sb+5/kg/dia (recomenda-se 15mg/Sb+5/kg/dia) e o tratamento dura no mínimo 20 dias (Neves, 2005). A Terapia Fotodinâmica (TFD) vem sendo estudada como alternativa de tratamento para a LTA. (Akilov et al, 2006)

A TFD parte do princípio de que a interação de luz de comprimento de onda adequado com um composto fotossensibilizante e oxigênio resultam em espécies reativas de oxigênio (oxigênio singleto) capazes de reduzir a viabilidade celular. (Sohl et al, 2007). Os efeitos da TFD no tratamento da leishmaniose tegumentar *in vitro* e *in vivo* têm sido alvo de estudos, com diversos fotossensibilizantes em variadas concentrações e com a aplicação de diferentes parâmetros do laser utilizado, como tempo de aplicação, comprimento de onda, entre outros (Akilov et al, 2007). As fitalocianinas como a Zinco Fitalocianina e Cloro Alumínio Fitalocianina têm sido estudadas e apontadas como fotosensibilizantes promissores. (Montanari e colaboradores, 2006). O objetivo

deste trabalho foi testar *in vitro* o efeito da TFD na viabilidade de *Leishmania major*.

Metodologia

Cultivo dos parasitas. Os parasitas, *Leishmania major*, foram cultivados em meio de cultura M199, complementado com Soro Fetal Bovino a 10% e mantidos a 28°C.

Aplicação da Terapia Fotodinâmica. A AIPcS₄ foi preparada em solução estoque de 1mM/ml e estocada a 4 °C. Os ensaios foram realizados em placas de 24 poços utilizando 1,0 x 10⁶ parasitas por poço. Foram testadas as concentrações de 1,0µM e 10,0µM da ftalocianina Alumínio Ftalocianina Tetrasulfonada (AIPcS₄) e Laser nas doses 5 e 10 J/cm². Os ensaios foram organizados em dois grupos: grupo A composto por Controle (parasitas somente), Luz (tratamento com o Laser), FS (tratado apenas como fotossensibilizante) de 1,0 µM e 10,0 µM, TFD com 1,0 µM e TFD com 10,0 µM e dose de 5 J/cm², e grupo B onde foi utilizada dose de 10 J/cm². A aplicação da TFD foi realizada segundo o protocolo descrito por Dutta e colaboradores (2005). O equipamento utilizado foi Laser (KONDOTECH[®]) de diodo semicondutor com meio ativo de AsGaAl com emissão contínua no infravermelho próximo (λ 790nm, 40mW).

Avaliação da atividade mitocondrial pelo teste de MTT. Após 18 horas da aplicação do laser foi realizado o teste de MTT segundo protocolo descrito por AKilov e colaboradores (2006).

Teste de viabilidade pelo método de exclusão com Azul de Trypan: Para esse teste 10µl da cultura de parasitas submetidos ao tratamento descrito, foram transferidos para tubos de 1,5 mL, onde foi adicionado 90 µl do azul de Trypan (Sigma®). Após homogeneizado, o número de parasitas vivos e mortos foram contados em câmara de Neubauer.

Resultados

O gráfico 1 mostra a viabilidade avaliada pela contagem com Azul de Trypan dos parasitas vivos e mortos do grupo A. Observa-se uma diminuição da porcentagem de parasitas vivos nos grupos tratados com a terapia fotodinâmica, e dos parasitas quando incubados apenas com o fotossensibilizante em relação ao grupo controle e ao grupo que recebeu apenas o tratamento com a luz.

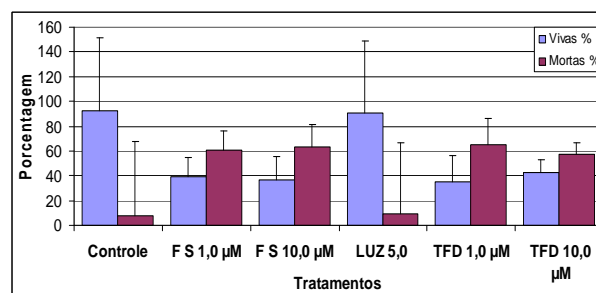


Gráfico 1: Avaliação da viabilidade de *Leishmania major* do grupo A pelo método de exclusão por Azul de Trypan.

O gráfico 2 mostra a avaliação da atividade mitocondrial dos parasitas do grupo A. Os resultados demonstram que a atividade mitocondrial é diminuída em todos os tratamentos quando comparados ao controle, exceto o grupo que recebeu apenas o fotossensibilizante na concentração de 10,0 µM, onde a atividade mitocondrial é comparável ao controle.

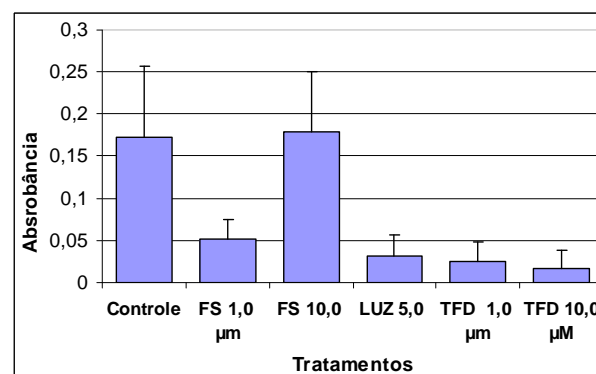


Gráfico 2: Atividade mitocondrial de *Leishmania major* do grupo A.

Os resultados da viabilidade dos parasitas avaliada por contagem com Azul de Trypan na TFD com potência de 10 J/cm² do grupo B são mostrados no gráfico 3. Observa-se diminuição na porcentagem de parasitas vivos nos grupos tratados com a TFD, em relação aos grupos Controle e Luz, principalmente no grupo que recebeu tratamento após incubação com 10 µM de AIPcS₄.

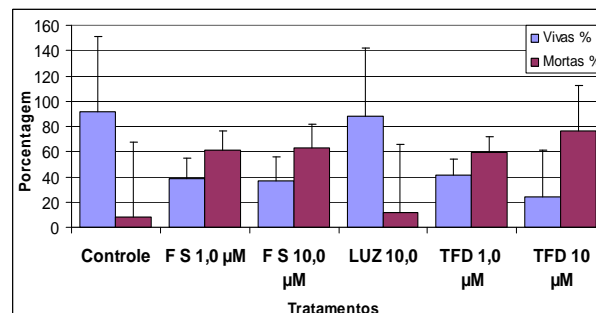


Gráfico 3: Avaliação da viabilidade de *Leishmania major* do grupo B pelo método de exclusão por Azul de Trypan.

Com relação à atividade mitocondrial dos parasitas deste grupo, avaliado pelo teste de MTT, (gráfico 4) houve diminuição da atividade da mitocôndria em todos os tratamentos, exceto para os parasitas tratados apenas com 10 μM de AIPcS₄.

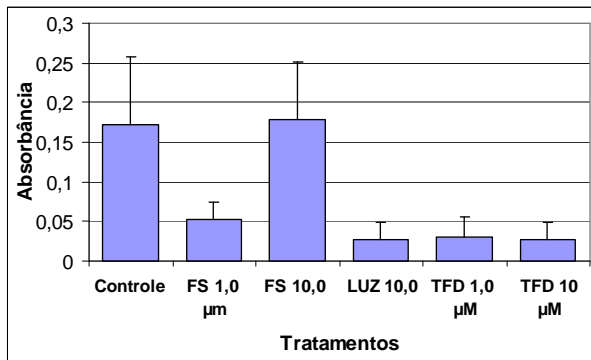


Gráfico 4: Atividade mitocondrial de *Leishmania major*.

Discussão

A proposta deste estudo foi testar *in vitro* o efeito da Terapia Fotodinâmica na viabilidade de *Leishmania major*.

Em seus estudos Akilov e colaboradores (2007) sugerem que a aplicação de Terapia fotodinâmica no tratamento da Leishmaniose é uma alternativa promissora, podendo ser utilizado como um tratamento alternativo a lesões causadas por parasitas resistentes aos tratamentos convencionais.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que a aplicação de TFD utilizando a AIPcS₄ diminui a viabilidade dos parasitas *in vitro* tanto pelo método de exclusão por Azul de Trypan quanto pelo método de MTT que avalia a atividade mitocondrial.

Os estudos de Dutta e colaboradores (2005) confirmam a sensibilidade da espécie *Leishmania amazonensi*, em co-cultivo com células J774 ao tratamento de Terapia Fotodinâmica.

A aplicação da TFD em pacientes com lesões cutâneas realizada por Enk e colaboradores (2007) demonstrou que a TFD é uma alternativa promissora no tratamento da Leishmaniose tegumentar.

É interessante considerar que Laser na ausência do fotossensibilizante foi capaz de inibir a atividade mitocondrial, mas está não representa mortalidade dos parasitas conforme demonstrado pela contagem de parasitas vivos e mortos.

Conclusão

Os resultados deste estudo, nas condições experimentais utilizadas, sugerem que a aplicação da TFD foi capaz de interferir na atividade mitocondrial e viabilidade dos parasitas, quando

comparado aos valores que obtivemos dos grupos Controles e dos grupos tratados apenas com a Luz, tanto no grupo A, quanto no grupo B. Sendo que os melhores resultados foram obtidos nos ensaios com 10,0 μM em ambas as doses utilizadas.

Observamos que apenas o teste de MTT não é um ensaio eficiente, para determinar se houve mortalidade dos parasitas, uma vez que ele demonstrou que só a luz é suficiente para diminuir a atividade mitocondrial, mas não para matar os parasitas, como demonstrado na contagem por Azul de Trypan.

São necessários ainda estudos mais completos envolvendo ensaios *in vitro*, utilizando o modelo de interação macrófago-leishmania e *in vivo* para compreender efeito da Terapia Fotodinâmica em lesões tegumentares causadas por este protozoário.

Referências

- Akilov, OE, Kosaka S, O'Riordan, Hasan T. Parasiticidal effect of-Gama-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells **Experimental dermatology** 2007; 16: 651-660
- Akilov OE, Kosaka S, O'Riordan K, Song X, Sherwood M, Flotte TJ, Foley JW, Hasan T. The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against *Leishmania* parasites. **Chemistry & Biology** 13, 839-847, august 2006
- Dutta S, Ray D, Kolli BK, Chang KP. Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminium phthalocyanine chloride for photolysis *in vitro*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Nov. 2005, p. 4474 – 4484
- Enk CD, Fritsch C, Jonas F, Nasereddin A, Ingber A, Jaffe CL, Ruzicka. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis With Photodynamic Therapy. **The Cutting Edge: Challenges in Medical and Surgical Therapeutics**, July 2007
- NEVES, David Pereira. **Parasitologia** dinâmica. São Paulo: Atheneu, 2003
- Sohl S, Kauer F, paasch U, Simon JC, Wetzig T. Photodynamic treatment of cutaneous leishmaniasis. **JDDG**; 2007- 5:128-130

- Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. 5ª Edição (revisada) – 2000

- Montanari, J.; Perez, A.P.; Salvo F. Di; Diz, V.; Barnadas, R.; Dixelio, L.; Doctorovich, F.; Morilla, M.J.; Romero, E.L. Photodynamic ultradeformable liposomes: Design and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**, November 2006

- Organização Mundial de Saúde. Disponível em : <http://www.who.int/zoonoses/diseases/leishmaniasis/en>; Acesso em 30 set. 2007