



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

MARICELY SÁNCHEZ URÍA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE PORFIRINAS
ASSOCIADAS À TERAPIA FOTODINÂMICA**

ARARAQUARA-SP 2022

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

MARICELY SÁNCHEZ URÍA

**AValiação da Atividade Leishmanicida de Porfirinas
Associadas à Terapia Fotodinâmica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação de Biotecnologia da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” para
obtenção do título de Mestre em Biotecnologia

Orientadora: Profa. Dr.^a MÁRCIA A. S. GRAMINHA

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a ANGELA MARIA ARENAS VELÁSQUEZ

Araraquara- SP

2022

U76a

Uría, Maricely Sánchez

Avaliação da atividade leishmanicida de porfirinas associadas à terapia fotodinâmica / Maricely Sánchez Uría. -- Araraquara, 2022

74 f. : il.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Química, Araraquara

Orientadora: Márcia Aparecida Silva Graminha

Coorientadora: Angela Maria Arenas Velásquez

1. Leishmaniose. 2. Fototerapia. 3. Doenças negligenciadas. 4. Porfirinas. 5. Células organelas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Química, Araraquara. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Avaliação da atividade leishmanicida de porfirinas associadas à terapia fotodinâmica"

AUTORA: MARICELY SÁNCHEZ URÍA

ORIENTADORA: MARCIA APARECIDA SILVA GRAMINHA

COORIENTADORA: ANGELA MARIA ARENAS VELASQUEZ

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia, pela Comissão Examinadora:



Dra. ANGELA MARIA ARENAS VELASQUEZ (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP – Araraquara

Carla Raquel Fontana Mendonça:
25045340867

Assinado digitalmente por Carla Raquel Fontana Mendonça 25045340867
DN: CN=Carla Raquel Fontana Mendonça 25045340867, OU=UNESP - Universidade Estadual Paulista
José de Mesquita Filho, OU=CFEA, C=BR
Raquel: Eu sou o autor deste documento.
Carla Raquel
2022.10.17 15:35:29

Profa. Dra. CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Mara Cristina

Assinado de forma digital por
Mara Cristina

Pinto: 1194058884

Pinto: 11940588847

7

Dados: 2022.10.17 15:35:29
-03'00'

Profa. Dra. MARA CRISTINA PINTO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Biológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Araraquara, 17 de outubro de 2022

Dados curriculares**Maricely Sánchez Uría****Lattes****Formação acadêmica/titulação****2015 – 2018**

Graduação em licenciatura em ciências biológicas. Universidade da Amazônia Belém Pará.
Título: Análise Físico-química e Microbiológica da Água Coletada de Poços Artesianos em 12 Bairros da Ilha de Mosqueiro-Pa. Orientador: Dirceu costa dos santos.

Formação Complementar**2016**

LIBRAS. Carga horária: 60 Horas

Escola Nacional de Administração Pública, ENAP, Brasil.

Elaboração de Gráficos para trabalhos acadêmicos usando Excel 2016. (Carga horária: 4h).

Universidade do Estado do Pará, UEPA, Brasil.

Cromatografia em Micromolecular de plantas (carga horária 4h)

Universidade do Estado do Pará, UEPA, Brasil.

2017

Estagiária do laboratório de microbiologia da Universidade do Estado do Para CCNT UEPA com carga horária de 400 h.

Estagiária do laboratório de Química de alimentos da Universidade do Estado do Para CCNT UEPA com carga horária de 400 h.

2018

Curso de aperfeiçoamento científico no laboratório de Bioquímica e Biologia. (Carga horária: 560h). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Brasil.

Monitoria do laboratório de microbiologia e Imunologia da Universidade da Amazônia (UNAMA)

Estágio no Bosque Rodrigues Alves com carga horária de 180h

2019

Análises da Qualidade da Água para consumo de água. (Carga horária: 8h). Universidade do Estado do Pará, UEPA, Brasil.

EXCEL. (Carga horária: 60h). Serviço Nacional de Aprendizagem Comercial, SENAC, Brasil.

LIBRAS. Carga horária: 60 Horas

Escola Nacional de Administração Pública, ENAP, Brasil.

Elaboração de Gráficos para trabalhos acadêmicos usando Excel 2016. (Carga horária: 4h).

2020 - 2020

CURSO: “Fundamentos de qPCR para análise de expressão gênica e quantificação de carga viral” oferecido pelo Laboratório de Análises Biomoleculares Multiusuários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP), no período de 19 a 22 de maio de 2020, com carga horária de 30 horas.

2021 – 2021

CURSO: “1 Semana de Virologia e Saúde Pública” oferecido pela primeira semana de virologia e saúde pública, Salvador Bahia, realizado nos dias 26 a 29 de abril de 2021, com carga horária de 12 horas. Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP)

CURSO: “Fundamentos de cromatografia líquida para a indústria farmacêutica” realizado de 9 a 13 de abril de 2021 com carga horária de 8 horas e 30 minutos. Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP)

CURSO: “Curso de extensão Universitária na modalidade de Difusão: Capacitação no uso e Manejo de Animais de Laboratório” Realizado de 23 de agosto de 2021 a 22 de novembro de 2021 com carga horária de 60 horas. ONLINE USP

PALESTRA: “Mecanismos Moleculares de ação de Drogas Tripanocidas e Leishmanicidas” Com duração de 12 horas, no período de 08/09/2021 a 09/09/2021. Rio de Janeiro, 15/09/2021 ON LINE FIOCRUZ

WEBINÁRIO: “Vacina para o Brasil” realizado no dia 13 de abril de 2021, no canal youtube da Academia Brasileira de Ciências (ABC), com carga horaria de 2 horas ONLINE

2022-2022

PALESTRA: “Simpósio online descomplicaleish 2.2” Com duração de 8 h, no período de 08/08/22 a 12/08/22

Idiomas

Espanhol: Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Inglês: Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Lê Razoavelmente, Escreve Razoavelmente.

Português: Compreende Bem, Fala Bem, Lê Bem, Escreve Bem.

Apresentação de Trabalho

URÍA, M. S.; MOREIRA, E. R.; OLIVEIRA, M. L. S. Determinação de compostos fenólicos e atividade antimicrobiana da própolis do município de castanhal. 2017. (Apresentação de Trabalho/Outra).

URÍA, M. S.; SÁNCHEZ URÍA.D.M.A. Avaliação Físico- Química de iogurtes desnatados comercializados em supermercados de Belém do Pará .2019.(Apresentação de Trabalho/Outra)

Organização de eventos, congressos, exposições e feiras

Participação na organização da palestra Evolução Químico-Biológica do Coacervado aos Primeiros Eucariotos. Universidade da Amazônia 2017

Participação na organização da amostra campus da Universidade da Amazônia 2017

Participação na organização da feira do meio ambiente 2017 da Universidade da Amazônia

Dedicatória

Dedico este trabalho a minha família no Perú em especial para a minha “abuelita” que sempre esteve presente em todos os momentos de minha vida que mesmo longe comemorou comigo a minha entrada neste mestrado dando apoio, conselhos e seu amor incondicional. A minha família aqui no Brasil que são a minha fortaleza, dedico também a todos os estudantes que algum dia pensaram que o sonho de ser mestre era impossível, acreditem em vocês pois são filhos do ser mais inteligente que existe: DEUS!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela força, foco, fé, saúde e resiliência de seguir adiante com este mestrado, pois sem a tua luz meu pai nada disso seria logrado!

Agradeço a minha família: Adriana minha irmã quase gêmea por todo o seu amor e carinho, ao meu irmão Oscar Mario pelas palavras de incentivo e amor, ao meu amado pai que mesmo doente sempre esteve ao meu lado dando muito amor e claro para minha amada, heroína meu tudo, mamãe Maricely Toro por todo o seu amor, puxões de orelha e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos dando apoio e palavras de motivação *“Nada en esta vida es imposible, todo se logra si tu tienes fé y pones de tu parte”*.

À minha abuelita Celinda que sempre orou por mim e esteve presente em todos os momentos mesmo estando longe obrigada por todo o amor que a senhora tem por mim espero com ânsias entregar a você este diploma de mestre para pendurar no seu quarto.

À minha família no Peru, abuelito Mario, Tias Marlenne, Rosário Uría e Charito, primos, primas e tios.

Aos meus avós paternos Olga e Augusto que já se foram sei que lá no céu vocês estão felizes por mais esta conquista.

Aos meus amados Pets Lilika, Meggy Olivia, Rocky e ao meu eterno amor Oliver.

Ao meu amado noivo Sávio por todo o seu amor que mesmo longe sempre tinha sábias palavras que confortam o meu coração.

A minha sogra Vanilde e cunhada Elis obrigada por todo carinho e por todas as orações vocês junto com o Sávio são a minha segunda família aqui no Brasil.

As minhas amigas da kitnet em Araraquara, Tais e Gabriela, obrigada pelo acolhimento e carinho.

Á Anayza e Kalel por toda a recepção e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanosomatídeos-UNESP:

Leandro, por ser um irmão que ganhei, obrigada por todos os ensinamentos, técnicas, experiências e conselhos.

Wilquer por ser o meu segundo irmão, parceiro de experimentos, parceiro de compras no supermercado e trocas de receitas. Obrigada por cada dica maravilhosa que você me deu ao longo desses 2 anos.

Eduarda a menina mais doce, meiga e I.C inteligente que conheci obrigada por todo o seu carinho.

Juliane por ser minha parceira de experimentos nos finais de semana e sempre esbanjar positividade mesmo quando os experimentos deram errado.

A Natália por toda a atenção e coleguismo.

Aos ICS do laboratório João, Ana Laura, Ana Clara, Helena e Jonatas pelo coleguismo e risadas no laboratório.

Michele minha parceira de experimentos, irmã que ganhei neste mestrado, parceira de loucuras e experiências no laboratório. Obrigada por todo o apoio não tenho palavras para definir minha gratidão a você e ao Marcel, OBRIGADA POR TUDO!

Gabriel pela amizade que sempre fez nascer um sorriso em meu rosto mesmo quando eu estava cansada ou desanimada, tu vinhas me fazer feliz seja dançando no laboratório ou rindo da nossa desgraça saiba que você sempre será a minha “gata “ favorita!

As meninas da limpeza que sempre foram atenciosas e carinhosas;

A recepcionista Viviane por cada conversa e companhia na hora do almoço;

Aos porteiros por toda preocupação das minhas longas noites no laboratório obrigada toda atenção e auxílio;

À minha co-orientadora, Dra. Angela M. A. Velásquez, que sempre admirei desde que comecei no estágio, obrigada por toda a paciência, compreensão e por sempre estar ao meu lado ensinando a ser pesquisadora, sou muito grata por ter sido orientada por você. Obrigada por tudo!

Ao Dr. Alexander Patino Linares por ter sido como o meu segundo co-orientador, obrigada por todos os ensinamentos e pela ajuda nos experimentos;

À minha orientadora, Profa. Dra. Márcia A. S. Graminha, pela oportunidade de ter me aceitado a trabalhar com você, por você ser a peça fundamental deste trabalho sempre buscando melhorias e pela confiança depositada a mim para seguir com este trabalho;

À Profa. Dra. Carla Raquel Fontana Mendonça pelo empréstimo do Led para os estudos de TFD e por toda a sua colaboração.

À Dra. Paula About Barbugli pelo auxílio no uso do microscópio confocal, atenção e disponibilidade.

Ao Dr Deivys pela ajuda na citometria e por toda a sua disponibilidade e conselhos.

Ao Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias por ter sintetizado as moléculas para este estudo.

À Dra. Pilar taboada por ter emprestado a balança analítica.

Ao Celso por sempre ser acessível e fornecer os animais para os experimentos.

A todos os funcionários da pós-graduação em bioctenologia por todo apoio.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - código de financiamento 001 (processo 88887.485451/2020-00) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

Obrigada a todos os professores e amigos que contribuíram nesta caminhada acadêmica.

Epigrafe

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Marthin Luther King)

RESUMO

As leishmanioses são doenças negligenciadas que afetam milhões de pessoas em todo o mundo. Os fármacos disponíveis para o tratamento apresentam diversos efeitos colaterais e difícil via de administração, o que causa abandono do tratamento pelo paciente e surgimento de cepas resistentes. Nosso grupo de pesquisa atua na etapa pré-clínica de desenvolvimento de fármacos contra as leishmanioses, testando moléculas de origem natural e/ou sintética e investigando seus possíveis mecanismos de ação. Neste trabalho, foi avaliada a atividade leishmanicida (EC_{50}) *in vitro* de oito porfirinas tetra-catiônicas (4-PtTPyP, 3-PtTPyP, 4-PdTPyP, 3-PdTPyP, 4-TPyP, 3-TPyP, 4-TMePyP, e 3-TMePyP) frente a *L. amazonensis* através de Terapia Fotodinâmica (TFD). Os compostos foram avaliados quanto à sua fotocitotoxicidade (CC_{50}) em macrófagos murinos e seus Índices de seletividade (IS) foram calculados. As porfirinas 3-PtTPyP (EC_{50} : $8,7 \pm 0,4$ nM; IS: 213), 3-PdTPyP (EC_{50} : 15 ± 5 nM; IS: 85,2) e 3-TPyP (EC_{50} : $25,5 \pm 7,5$ nM; IS: 61,9) utilizadas como fotossensibilizadores (FS) através de TFD mostraram-se as mais fototóxicas frente às formas promastigotas do parasita. Já na atividade anti-amastigota (EC_{50-AMA}) foi constatado que em geral os FS: 3-TPyP ($47,9 \pm 4,4$ nM; IS: 32), 3-PdTPyP ($38,8 \pm 11,5$ nM; IS: 32,9) e 3-PtTPyP ($27,6 \pm 6,7$ nM; IS: 67) são ótimos candidatos para serem futuramente testados *in vivo*. Devido a interação entre os FS e a luz, foi mensurada a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), encontrando-se que as porfirinas 4-PtTPyP, 3-PtTPyP e 3-PdTPyP induziram os níveis mais altos de EROs no parasita. Adicionalmente, ensaios de co-localização com as porfirinas foram realizados utilizando os marcadores MitoTracker Orange (marcador de mitocôndria) e LysoTracker Green (marcador de lisossomos ou pools ácidos) por microscopia confocal, encontrando-se co-localização das moléculas em ambas as organelas, mitocôndria e pools ácidos. Análises do tipo de morte celular potencialmente induzida pelos FSs foram realizadas através da marcação com brometo de etídio/laranja de acridina (BE/LA). As moléculas 3-PdTPyP, 3-PtTPyP e seus isômeros (4-PdTPyP, 4-PtTPyP) na presença de luz branca após 6 e 24 h de irradiação mostraram-se como os FSs com maior efeito leishmanicida. 3-PdTPyP e 3-PtTPyP induziram a morte do parasita principalmente por necrose (74,2% e 52,2% após 6h, respectivamente; e 79% e 78% após 24h, respectivamente). Enquanto que o isômero 4-PtTPyP induz a morte das promastigotas por like-apoptose (81%) após 6h de irradiação, e após 24 h direcionou os parasitas a morte por necrose (33,6%) e like-apoptose (28,2%), similar ao observado no isômero 4-PdTPyP em ambos os tempos (40% necrose/20% like-apoptose e 54,5% necrose/25,5% like-apoptose, após 6h e 24h de irradiação, respectivamente). Estes dados sugerem que as porfirinas tetra-catiônicas de platina e paládio aqui utilizadas têm um grande potencial para serem utilizadas no tratamento da leishmaniose cutânea por meio de terapia fotodinâmica.

Palavras-chave: Leishmanioses, Terapia Fotodinâmica, *Leishmania amazonensis*, Porfirinas, mitocôndria, lisossomos.

ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected diseases that affect millions of people worldwide. The drugs available for treatment have several side effects and a difficult route of administration, which causes the patient to abandon treatment and the emergence of resistant strains. Our research group works in the pre-clinical stage of drug development against leishmaniasis, testing molecules of natural and/or synthetic origin and investigating their possible mechanisms of action. In this work, the in vitro leishmanicidal activity (EC_{50}) of eight tetracationic porphyrins (4-PtTPyP, 3-PtTPyP, 4-PdTPyP, 3-PdTPyP, 4-TPyP, 3-TPyP, 4-TMePyP, and 3-TMePyP) against *L. amazonensis* through Photodynamic Therapy (PDT). Compounds were evaluated for their photocytotoxicity (CC_{50}) on murine macrophages and their selectivity indices (IS) were calculated. The porphyrins 3-PtTPyP (EC_{50} : 8.7 ± 0.4 nM; IS: 213), 3-PdTPyP (EC_{50} : 15 ± 5 nM; IS: 85.2) and 3-TPyP (EC_{50} : 25.5 ± 7.5 nM; IS: 61.9) used as photosensitizers (FS) through PDT proved to be the most phototoxic against the promastigote forms of the parasite. In the anti-amastigote activity (EC_{50-AMA}) it was found that in general the FS: 3-TPyP (47.9 ± 4.4 nM; IS: 32), 3-PdTPyP (38.8 ± 11.5 nM; IS: 32.9) and 3-PtTPyP (27.6 ± 6.7 nM; IS: 67) are excellent candidates to be tested in vivo in the future. Due to the interaction between FS and light, the production of reactive oxygen species (ROS) was measured, and the porphyrins 4-PtTPyP, 3-PtTPyP and 3-PdTPyP induced the highest levels of ROS in the parasite. Additionally, co-localization assays with porphyrins were performed using the markers MitoTracker Orange (mitochondria marker) and LysoTracker Green (lysosomes or acidic pools marker) by confocal microscopy, finding co-localization of the molecules in both organelles, mitochondria and acidic pools. Analyzes of the type of cell death potentially induced by FSs were performed by labeling with ethidium bromide/acridine orange (BE/LA). The molecules 3-PdTPyP, 3-PtTPyP and their isomers (4-PdTPyP, 4-PtTPyP) in the presence of white light after 6 and 24 h of irradiation showed to be the FSs with the greatest leishmanicidal effect. 3-PdTPyP and 3-PtTPyP induced parasite death mainly by necrosis (74.2% and 52.2% after 6h, respectively; and 79% and 78% after 24h, respectively). While the 4-PtTPyP isomer induced death of promastigotes by like-apoptosis (81%) after 6h of irradiation, and after 24h it directed the parasites to death by necrosis (33.6%) and like-apoptosis (28.2 %), similar to that observed in the 4-PdTPyP isomer at both times (40% necrosis/20% like-apoptosis and 54.5% necrosis/25.5% like-apoptosis, after 6h and 24h of irradiation, respectively). These data suggest that the tetracationic platinum and palladium porphyrins used here have great potential to be used in the treatment of cutaneous leishmaniasis by means of photodynamic therapy.

Key-words: Leishmaniasis. *Leishmania amazonensis*. Porphyrins. photodynamic therapy

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Moléculas da classe de Porfirinas utilizadas para avaliar seu potencial leishmanicida utilizando TFD neste trabalho	35
Tabela 2 - Atividade fototóxica <i>in vitro</i> de porfirinas frente a <i>L. amazonensis</i> e (EC ₅₀), macrófagos murinos (CC ₅₀) e atividade fototóxica <i>in vitro</i> de porfirinas frente formas amastigotas a <i>L. amazonensis</i> por meio da TFD.	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Ciclo da vida da <i>Leishmania</i> Avaliação da acumulação das Porfirinas em formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	20
Figura 2- Manifestações clínicas da leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea	22
Figura 3- Processo fotoquímico e foto-físico do FS ilustrado no diagrama de Jablonski modificado para a TFD. O FS no seu estado singlete excitado intersistemas formando um estado tripleto excitado mais estável	23
Figura 4- Profundidade de luz nos tecidos	28
Figura 5- – Estrutura da porfirina	31
Figura 6 - Avaliação da acumulação das Porfirinas em formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> .	41
Figura 7- Avaliação da proliferação celular de <i>L. amazonensis</i> Porfirinas Catiônicas tetra platinadas (4-PtTPyP e 3-PtTPyP), Porfirinas catiônicas de paládio (4-PdTPyP e 3- PdTPyP), Porfirinas neutras pirimidil (4-TPyP e 3-TPyP) e Porfirinas tetra metiladas (4-TMePyP e 3- TMePyP) na ausência de luz branca (escuro). O controle corresponde às formas promastigotas de <i>Leishmania</i> na ausência de FS.	43
Figura 8- Avaliação da proliferação celular de <i>L. amazonensis</i> na presença de Porfirinas Catiônicas tetra platinadas (4-PtTPyP e 3-PtTPyP) usando TFD na presença (72 J/cm ² e 144 J/cm ²)	44
Figura 9 - Avaliação da proliferação celular de <i>L. amazonensis</i> na presença de Porfirinas Catiônicas tetra paladadas (4-PdTPyP e 3-PdTPyP) usando TFD na presença (72 J/cm ² e 144 J/cm ²).	44
Figura 10 Avaliação da proliferação celular de <i>L. amazonensis</i> na presença de Porfirinas Catiônicas neutra pirimidil (4-TPyP e 3-TPyP) usando TFD na presença (72 J/cm ² e 144 J/cm ²). O controle corresponde às formas promastigotas de <i>Leishmania</i> na ausência de FS.	45
Figura 11- Avaliação da proliferação celular de <i>L. amazonensis</i> na presença de Porfirinas Catiônicas tetra metiladas (4-TMeTPyP e 3-TMeTPyP) usando TFD na presença (72 J/cm ² e 144 J/cm ²) .O controle corresponde às formas promastigotas de <i>Leishmania</i> na ausência de FS.	45
Figura 12- Avaliação da viabilidade celular frente a macrófagos murinos de porfirinas catiônicas tetra platinadas (4-PtTPyP e 3-PtTPyP), porfirinas catiônicas de paládio (4-PdTPyP e 3- PdTPyP), porfirinas neutras pirimidil (4-TPyP e 3-TPyP) e porfirinas tetra metiladas (4-TMePyP) na ausência de luz branca (escuros).	47
Figura 13- Avaliação do efeito foto-citotóxico de porfirinas catiônicas tetra platinadas, 3-PtTPyP e 4-PtTPyP , frente a macrófagos peritoneais de camundongo usando TFD na presença (72 J/cm ²).	47
Figura 14– Avaliação do efeito foto-citotóxico de porfirinas Neutras -piridil, 3-TPyP , 4-TPyP frente a macrófagos peritoneais de camundongo usando TFD na presença de luz branca (72 J/cm ²).	48
Figura 15- Avaliação do efeito foto-citotóxico de porfirinas catiônicas tetra paladadas, 4-PdTPyP e 3-PdTPyP frente a macrófagos peritoneais de camundongo usando TFD na presença de luz branca (72 J/cm ²).	48
Figura 16 Avaliação do efeito foto-citotóxico de porfirina catiônica tetra Metilada 4-TMePyP frente a macrófagos peritoneais de camundongo usando TFD na presença de luz branca (72 J/cm ²).	49

Figura 17- Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio utilizando 150 nM das porfirinas catiônicas tetra platinadas (4-PtTPyP e 3-PtTPyP), tetra paladadas (4-PdTPyP e 3-PdTPyP) e neutras (3-TPyP , 4-TPyP) após 6h e 24h de incubação usando TFD na presença de luz branca (72 J/cm ²).	51
Figura 18- Localização celular em <i>Leishmania amazonensis</i> da porfirina 3-PtTPyP a 150 nM incubada por 24h e visualizada por microscopia confocal de fluorescência	53
Figura 19- Mecanismo de morte celular potencialmente induzido pela porfirina (a) 3-PtTPyP e (b) 3PdTPyP associados a TFD frente a <i>Leishmania</i> .Imagens representativas de microscopia confocal de fluorescência de promastigotas de <i>L.amazonensis</i> marcadas com BE/LA após 6h e 24h de irradiação com a luz branca 72J/cm ² previamente incubadas com 150 nM de cada..	54
Figura 20- Mecanismo de morte celular potencialmente induzido por derivados de porfirinas associados à TFD frente a <i>Leishmania amazonensis</i> . Porcentagem de células vivas, em processo de <i>like</i> -apoptose e/ou necrose após (a) 6h e (b) 24 h de incubação com os FSs (150 nM) seguidos do processo de irradiação com luz branca (72 J/cm ²)	55
Figura 21 -- Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio utilizando 150 nM das porfirinas catiônicas tetra platinadas (4-PtTPyP e 3-PtTPyP) paládio (4-PdTPyP e 3-PdTPyP) e neutras (3-TPyP , 4-TPyP), após 6h e 24h de incubação usando TFD na ausência de luz branca (72 J/cm ²).	67
Figura 22- Avaliação da acumulação de porfirinas em promastigotas de <i>L.amazonensis</i>	67
Figura 23- Localização celular em <i>Leishmania amazonensis</i> da porfirina 3-PdTPyP a 150 nM incubada por 24h e visualizada por microscopia confocal de fluorescência.	68
Figura 24- Localização celular em <i>Leishmania amazonensis</i> da porfirina 3-TPyP a 150 nM incubada por 24h e visualizada por microscopia confocal de fluorescência	69
Figura 25 Mecanismo de morte celular potencialmente induzido pela porfirina (a) 4-TPyP e (b) 3-TPyP associadas a TFD frente a <i>Leishmania</i> .Imagens representativas de microscopia confocal de fluorescência de promastigotas de <i>L.amazonensis</i> marcadas com BE/LA após 6h e 24h de irradiação com a luz branca 72J/cm ² previamente incubadas com 150 nM de cada FSs.	70
Figura 26 - Mecanismo de morte celular potencialmente induzido pela porfirina (a) 4-PtTPyP e (b) 4-PdTPyP associadas a TFD frente a <i>Leishmania</i> .Imagens representativas de microscopia confocal de fluorescência de promastigotas de <i>L.amazonensis</i> marcadas com BE/LA após 6h e 24h de irradiação com a luz branca 72J/cm ² previamente incubadas com 150 nM de cada FSs.	71

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AnfB	Anfotericina B
Ânions superóxido	(O ₂ ^{·-})
CC ₅₀	Concentração Citotóxica para 50% da população
DMSO	Dimetilsulfóxido
DN	Doença Negligenciada
DNDi.	Iniciativa de Fármacos para Doenças Negligenciadas
EC ₅₀ -AMA	Concentração Efetiva para 50% de formas amastigotas
EC ₅₀ -PRO 3FS	Concentração Efetiva para 50% de formas promastigotas Estado tripleto
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizador
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
FcγRs	Receptores Gama Fc
LC	Leishmaniose Cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LM	Leishmaniose Mucocutânea
Lipofosfoglicano	LPG
MHC II	Complexo de Histocompatibilidade II
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]- 2,5-difenil tetrazólio
NO	Óxido Nítrico
PMS	Metossulfato de fenazina
PS	Fosfatidilserina
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
RPMI	Meio Roswell Park Memorial Institute
SFBI	Soro fetal bovino inativado
HO [·]	Radical de hidroxila
Th1	Célula T helper tipo 1
Th2	Célula T helper tipo 2
TNF-α.	Fator de Necrose Tumoral α
λ	Comprimento de onda

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Doenças negligenciadas	19
1.2 <i>Leishmania</i>	19
1.3 CICLO BIOLÓGICO	19
1.4 Espécies de leishmanias	21
1.4.1 Leishmaniose visceral ou calazar:	21
1.4.2 Leishmaniose cutânea:	21
1.4.3 Leishmaniose mucocutânea:	21
1.4.4 Tratamentos Disponíveis para as leishmanioses	22
1.5 Histórico da terapia fotodinâmica e seu mecanismo de ação.	25
1.6 Propagação da luz no tecido alvo	27
1.7 Fotossensibilizadores	28
1.8 Porfirinas	30
2.0 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua atividade leishmanicida	31
2.1 Colocalização	32
2.2 Lisossomos	32
2.3 Mitocôndrias	33
3 OBJETIVOS	34
4. METODOLOGIA	35
4.1 Cultivo dos parasitas	35
4.2 Moléculas da classe das porfirinas Estudadas	35
4.3 Avaliação da captação - <i>Uptake</i> das Porfirinas em <i>Leishmania amazonensis</i>	36
4.4 Atividade anti-promastigota	37
4.5 Avaliação da Foto-citotoxicidade	38
4.6 Atividade anti- amastigota	38
4.7 Cálculo do Índice de seletividade (IS)	39
4.8 Medida do acúmulo de EROs intracelular	39
4.9 Colocalização	40
4.10 Avaliação do tipo de mecanismo de morte potencialmente induzido por Porfirinas usando TFD utilizando a coloração de brometo de etídio/laranja de acridina (BE/LA)	40
5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
5.1 Avaliação da acumulação de Porfirinas em promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	41

5.2 Avaliação da atividade anti-leishmanial de Porfirinas frente a <i>Leishmania</i> usando TFD	42
5.3 Mecanismo de ação das porfirinas frente a <i>Leishmania</i> por medio de TFD	50
6.0 CONCLUSÕES	58
7.0 REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE 1	67

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses fazem parte do grupo de doenças negligenciada que afeta cerca de 90 países no mundo sendo endêmicas em todos os continentes, com prevalência/incidência maior no Sudeste Asiático, na África subsaariana e na América Latina (com mais de 95% dos casos registrados), além de possuir registro também em países do sul da Europa, exceto na Austrália e na Antártica. As leishmanioses são causadas por mais de 20 espécies diferentes do protozoário parasita *Leishmania* spp. (*Trypanosomatidae*) e transmitida ao homem por meio da picada de um flebotomíneo fêmea infectado (*Diptera, Psychodidae*) durante o repasto sanguíneo. Entre as principais manifestações clínicas temos a leishmaniose cutânea (LC) mucocutânea (LM), cutânea difusa (LCD) e visceral (LV) que se não tratada pode levar ao óbito. Estima-se que 350 milhões de pessoas estejam em risco e mais de 2 milhões de novos casos sejam reportados anualmente (MANN et al., 2021), WHO, 2021).

O tratamento atual inclui o uso de distintos fármacos que têm benefícios e limitações particulares. O antimônio pentavalente, descoberto em 1912, tem sido considerado o fármaco antileishmanial de primeira linha. Entretanto, os crescentes relatos de isolados clínicos de *Leishmania* spp. resistentes a este composto restringem seu uso. Em estudos mais recentes, de acordo com a Iniciativa de Medicamentos para Doenças Negligenciadas (*DNDi* do inglês *Drugs for Neglected Diseases Initiative*), a anfotericina B (Anf B) mostrou ser mais acessível aos pacientes por conta do menor tempo de duração no tratamento e menos efeitos colaterais diminuindo assim o tempo de internação. Desta forma, a Anf B e suas formulações lipossomais passam a ser fármacos de referência (CABRAL., et al, 2021, DNDI, 2022).

Outros fármacos encontram-se disponíveis para o tratamento das leishmanioses, como é o caso da pentamidina, miltefosina e paramomicina, sendo relatados diversos efeitos colaterais (SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021)

A continuação, alguns aspectos relacionados às leishmanioses e seu tratamento serão descritos em detalhe.

1.1 Doenças negligenciadas

As doenças negligenciadas (DNs) pertencem a um grupo de variadas doenças endêmicas presentes em regiões tropicais e subtropicais de 149 países. As regiões de populações pobres da África, Ásia e América Latina juntas possuem mais de 200 milhões de pessoas, tendo como custo às economias em desenvolvimento bilhões de dólares todos os anos. As populações mais afetadas vivem em regiões de pobreza, sem saneamento básico adequado e carecem de recursos básicos de saúde que estão diretamente associados a problemas de desnutrição e sistema imunológico fraco, além de estar em contato com vetores e animais domésticos, os quais podem ser reservatórios de muitas doenças (DNDI, 2022). De acordo com as DN existentes, as leishmanioses são responsáveis pelos altos índices de taxas de morte e que possuem pouco interesse da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos fármacos (DNDI, 2022).

1.2 *Leishmania*

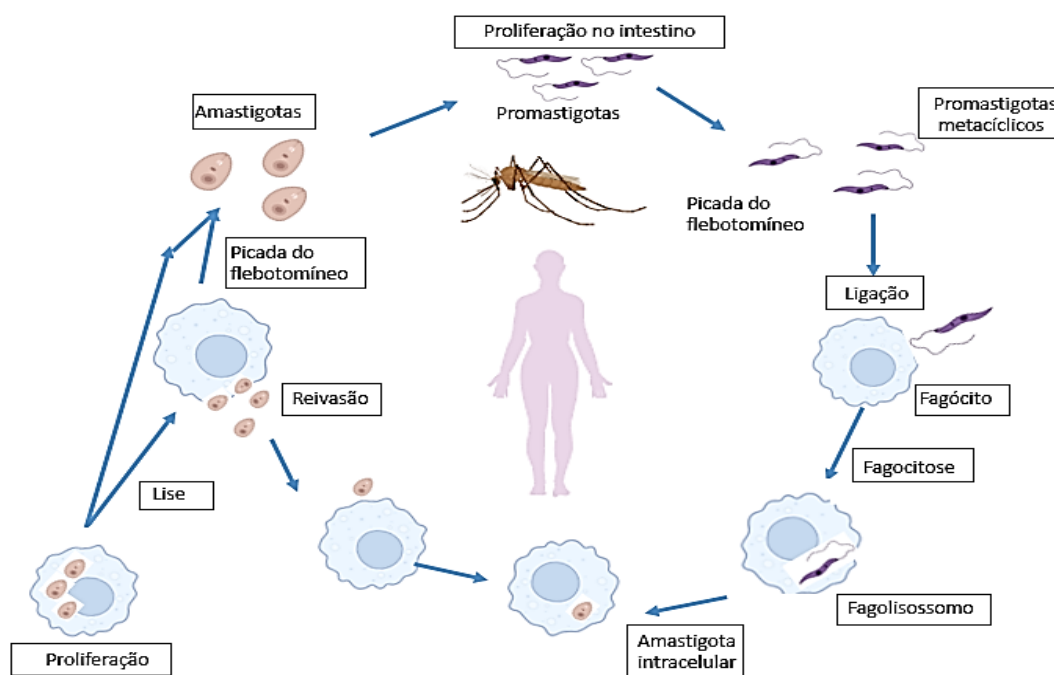
São protozoários eucariontes que possuem um único DNA mitocondrial com um corpo estruturado denominado de cinetoplasto, organelas específicas para a glicólise: os glicossomos, e um metabolismo único de tiol como metabolismo de defesa contra as espécies reativas de oxigênio (EROs) (BARRETT; CROFT, 2012; BARROS ALVAREZ et al., 2014). Estes protozoários possuem duas formas: promastigota, a forma extracelular flagelada (10-20 μm) com formato alongado encontrada no sistema digestivo dos flebotomíneos (STUART et al., 2008) e as formas amastigotas intracelulares (3-7 μm de diâmetro), sem flagelo exteriorizado, que possui formato arredondado onde seu cinetoplasto localiza-se ao lado do núcleo. As amastigotas se encontram preferencialmente nas células de defesa (macrófagos) de hospedeiros mamíferos (KAYE; SCOTT, 2011).

1.3 CICLO BIOLÓGICO

O ciclo biológico começa quando a fêmea do inseto vetor flebotomíneo (hospedeiro invertebrado) coloca o aparelho bucal em contato com a derme do hospedeiro mamífero, injetando as formas promastigotas que são alongadas e extracelulares e infectantes na fase metacíclica (MONZOTE, 2009). Dentro da célula hospedeira dos mamíferos estas promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos (KAYE; SCOTT, 2011). Depois da ocorrência da fagocitose se origina o fagossomo onde as promastigotas se diferenciam em

amastigotas que são formas arredondadas e intracelulares (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003). No fagossomo as amastigotas se multiplicam por divisão binária causando a lise do macrófago infectado liberando as formas amastigotas que serão fagocitadas por outro macrófago (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). Durante outro repasto sanguíneo, o flebotomíneo ao injetar o seu aparelho bucal na derme do hospedeiro mamífero acaba ingerindo os macrófagos infectados que acabam sofrendo a lise celular liberando as amastigotas. Estas por sua vez se convertem em promastigotas não infectivas no intestino do flebotomíneo e ficam no esôfago e faringe do flebotomíneo, onde ficam aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando então atingem o estágio infectivo terminal estas são encontradas como promastigotas infectivas (promastigota metacíclica). Desta forma, o ciclo se completa. Como pode ser visto na figura 1 (KAYE; SCOTT, 2011)

Figura 1- Ciclo biológico de *Leishmania spp.*



As promastigotas procíclicas de spp. *Leishmania* são diferenciadas nos flebotomíneos em formas promastigotas metacíclicas infecciosas. Quando ocorre o repasto sanguíneo, o inseto regurgita as formas metacíclicas, que são fagocitados pelos macrófagos. Após a aderência dos parasitas nas células de defesa as promastigotas transformam-se em amastigotas aflageladas, as quais fazem a replicação dentro das células hospedeiras, ocorrendo assim, o rompimento da célula permitindo a reinfecção dos fagócitos locais. O ciclo de transmissão estará completo quando os fagócitos infectados são capturados por outro flebotomíneo.

Fonte: Adaptado de (KAYE; SCOTT, 2011)

1.4 Espécies de leishmanias

1.4.1 Leishmaniose visceral ou calazar:

A principal manifestação clínica está associada ao desenvolvimento da hepatoesplenomegalia (aumento do fígado e baço), febre prolongada, perda de peso e anemia (MANN et al.; 2021; WHO, 2022). No caso o diagnóstico ocorre de forma tardia a doença evolui progressivamente para o estágio mais avançado da doença com sintomas de febre contínua, desnutrição com cabelos quebradiços e pele seca, edema nos membros inferiores a qual pode evoluir para o inchaço generalizado do corpo e hemorragias levando a morte do paciente (BRASIL, 2014).

1.4.2 Leishmaniose cutânea:

Não é fatal, mas pode levar a algumas consequências como uma morbidade estética substancial, estigmatização social, e efeitos psicológicos (BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, 2018). Esta forma é mais comum dos casos, sendo caracterizadas por lesões ulcerosas ou nodulares únicas múltiplas na pele que podem se tornar crônicas (MANN et al., 2021). As lesões têm formato arredondado ou ovalado; podendo medir alguns milímetros ou centímetros; possuem a base eritematosa, infiltrada e de consistência firme; com bordas bem delimitadas e elevadas com fundo avermelhado e granulações grosseiras. (BRASIL., 2017). Deixando cicatrizes permanente, o que está relacionado com o detrimento da saúde mental dos pacientes (MANN et al., 2021; WHO, 2022). Essas lesões na maioria das vezes podem desencadear problemas estéticos para os pacientes, embora possam afetar a qualidade de vida, principalmente em adultos mais jovens (BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, 2018).

1.4.3 Leishmaniose mucocutânea:

Conhecida como “espúdia” acontece tempo depois da manifestação cutânea deixando à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta (GOTO; LINDOSO, 2010). É caracterizada por lesões muito destrutivas do septo nasal, lábios e palato, isso é por causa da forte resposta imunopatológica. (BRASIL, 2017). A leishmaniose mucocutânea pode ser considerada como fatal levando a desfiguração permanente e precisa ser diagnosticada com rapidez. (BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, 2018)

É importante salientar que associado ao quadro clínico crítico das leishmanioses, especificamente da LV, é retratado na literatura casos de coinfeção com doenças autoimunes como pacientes portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Em pacientes imunocomprometidos, os parasitas de *Leishmania* podem persistir por vários anos após o tratamento, e não há imunidade estéril. Isto ocorre por conta da reativação fulminante da infecção que é possível quando a imunidade está comprometida, como por exemplo, à terapia imunossupressora pós-transplante, uso de imunossupressores (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018). A ocorrência da coinfeção LV-HIV pode estar associada com a migração econômica das pessoas do campo para a cidade e vice-versa onde a LV é prevalente (LAULETTA; CUNHA; QUEIROZ, 2016). Desta forma, as leishmanioses se tornam ainda mais agravantes. Na figura 2 se apresentam as três manifestações clínicas de leishmaniose.

Figura 2. Manifestações clínicas da leishmaniose visceral, cutânea e mucocutânea.



Em (A) leishmaniose visceral (B) leishmaniose cutânea e (C) leishmaniose mucocutânea. Fonte: (BARRETT; CROFT, 2012).

1.4.4 Tratamentos Disponíveis para as leishmanioses

Atualmente, os medicamentos usados contra a leishmaniose baseiam-se na utilização de cinco fármacos como referência: antimoniais pentavalentes, a Anf B e a sua formulação lipossômica, miltefosina, a paromomicina e a pentamidina (DNDI., 2022). No entanto, todos os fármacos disponíveis atualmente para o tratamento das leishmanioses mostram-se insatisfatórios em termos de eficácia, facilidade de administração e custo (MCGWIRE, SATOSKAR, 2014; HENDRICKX; ALJON; MAES, 2019).

Os antimoniais trivalentes (SbIII) já eram utilizados no Brasil desde de 1912 como tratamento de primeira escolha eficaz para leishmaniose (HENDRICKX; CALJON; MAES, 2019). Estes fármacos são comercializados em duas formulações: SSG como Pentostam) e antimoniato de meglumina (MA, comercializado como Glucantime) e são administrados por via intramuscular (IM) ou intravenosa (IV) (KIP et al., 2018). O antimônio pentavalente (SbV) é considerado um pró-fármaco, pois é convertido na forma de trivalente (SbIII) (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Os pentavalentes possuem o mecanismo de ação que atua dentro do organismo gerando toxicidade tanto contra o hospedeiro quanto contra o parasito (SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021). Por conta de gerar vários efeitos colaterais como vômito, diarreia, náusea, dor de cabeça, fadiga, febre, tosse, erupção cutânea, pancreatite, pneumonia, insuficiência hepática, nefrotoxicidade e cardiotoxicidade (HENDRICKX; CALJON; MAES, 2019). Além de possuírem casos de resistência seu uso tem sido restringido em certas áreas do mundo (OLÍAS-MOLERO et al., 2021). Diante disso, de acordo com a PAHO 2022 o uso dos pentavalentes nas américas está sendo substituído para os fármacos de segunda escolha como a Anf B.

Anf B é um antibiótico com atividade antifúngica isolada pela primeira vez no ano de 1955 da bactéria *Streptomyces nodosus* na Venezuela (CHATTOPADHYAY; JAFURULLA, 2011). A solubilidade em água é muito limitada com baixa permeabilidade em membranas, possui baixa absorção e baixa disponibilidade oral, sendo administrada por via intravenosa (SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021). O mecanismo de ação no parasita funciona através da interação da Anf B com a membrana lipídica do parasita, principalmente com esteróis (ergosterol e colesterol) levando à formação de canais e/ou poros que incrementam a permeabilidade da membrana celular para íons e pequenos solutos o que causa um desequilíbrio celular ocasionando a morte do parasita (VARLAN, 2001; SEIFERT, 2011; VAN ASSCHE et al., 2011; CHATTOPADHYAY, JAFURULLA., 2011). Anf B também está relacionada com o estresse oxidativo promovendo a formação de EROs que causam oxidação proteica e peroxidação fosfolipídica da membrana celular (AN et al., 2009).

O uso da Anf B é limitado devido à graves efeitos tóxicos como insuficiência renal e nefrotoxicidade, por necessitar de hospitalização do paciente por alguns dias para sua aplicação (ECHEVARRIA et al., 2006; SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021), o que resulta na não aderência ao tratamento, e conseqüentemente, ao aparecimento de casos de resistência (PURKAIT et al, 2012).

Por conta dos efeitos adversos da Anf B e de forma atenuar sua toxicidade e aumentar o seu potencial terapêutico foram pesquisadas formulações alternativas de

anfotericina B que possam melhorar a sua eficácia (**Amphocil®**, **Abelcet®** e, particularmente, **AmB lipossomal** e **Ambisome®**) (OLÍAS-MOLERO et al., 2021; HAMILL,2013). Essas formulações consistem em incorporar a Anf B na bicamada de lipossomas resultando em uma redução significativa da toxicidade renal (SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021). Porém as formulações lipossomais e lipídica são mais caras que a Anf B desoxicolato e acabam sendo inacessíveis para a maioria dos pacientes (MATOS et al., 2020; OLÍAS-MOLERO et al., 2021)

A pentamidina é um derivado sintético da amidina usado como terapia de segunda linha contra a leishmaniose, sua administração é por via intramuscular, ou preferencialmente, por via intravenosa (NO, 2016). O mecanismo de ação no parasita seria na interferência com a síntese de DNA e modifica a morfologia do cinetoplasto e também atuando na mitocôndria como um alvo. Mas, possui efeitos colaterais como a nefrotoxicidade, hipotensão, leucopenia, anemia, arritmias, náuseas, vômito, polineuropatia periférica, hepatites e alterações neurológicas diabetes mellitus, hipoglicemia grave, choque, miocardite e toxicidade renal. (SANTIAGO; PITA; GUIMARÃES, 2021; SINGH; KUMAR; SINGH, 2012).

A Paromomicina é um antibiótico do grupo aminoglicosídeo sendo um dos medicamentos com atividade terapêutica de segunda escolha para a LC e LV. O alvo principal para a atividade antileishmanial ocorre no ribossomo do parasita inibindo a síntese de proteínas por meio da inibição da translocação e reciclagem de subunidades dos ribossomos (GOTO, H., LINDOSO, 2010; LINDOSO et al., 2012). A membrana do parasita é alterada por conta da fluidez, e atua também na alteração do metabolismo e respiração mitocondrial do parasita (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Os efeitos adversos são a ototoxicidade, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e edema (SANTIAGO;PITA;GUIMARÃES, 2021).

A miltefosina, uma hexadecilfosfocolina, é o único medicamento de uso oral para o tratamento da leishmaniose, sua descoberta foi em 1998 na Índia para tratar a LV (NO, 2016) O seu mecanismo de ação ainda não está completamente elucidado, contudo, sugere se que a miltefosina induz alterações na membrana do parasita com despolarização da membrana mitocondrial e inibição da citocromo-c oxidase, o que poderia relacionar-se a morte dos parasitos por apoptose. A miltefosina também produz efeitos colaterais graves como vômitos, vertigem diarreia, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e eratoxicidade - desenvolvimento anormal no feto, o que acaba dificultando o seu uso em mulheres grávidas e crianças. Além de possuir casos de resistência (OLÍAS-MOLERO et al., 2021; SANTIAGO;PITA; GUIMARÃES,2021).

Diante das limitações decorrentes da utilização dos fármacos existentes torna-se necessário a busca por novas alternativas terapêuticas mais eficazes e menos tóxicas. É assim, que o Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular de Tripanossomatídeos da FCF-UNESP/Araraquara vem nos últimos anos buscando novas moléculas, sejam naturais ou sintéticas, para seu uso como potenciais compostos antileishmaniais com melhor eficácia e menor toxicidade. Adicionalmente, o uso de outras alternativas terapêuticas, como é o caso do uso de FSs para uso por meio de TFD também têm sido avaliados pelo nosso grupo de pesquisa. De acordo com trabalhos anteriores publicados por nosso grupo de pesquisa, LOPERA e colaboradores (2020), demonstraram que nanopartícula conjugadas a um reconhecido FSs, $\text{TiO}_2/\text{Zn-HY}$, apresentaram uma importante atividade fototóxica frente ao parasita (EC_{50} de $17,5 \pm 0,2 \mu\text{g mL}$) e baixa citotoxicidade contra macrófagos murinos (CC_{50} $35,2 \pm 0,3 \mu\text{g mL}$) no tratamento com luz visível (22 mW cm^{-2} ; $52,8 \text{ J cm}^{-2}$). Ademais, nas análises *in vivo*, $\text{TiO}_2/\text{Zn-HY}$ diminuiu a carga parasitária de camundongos infectados com *L. amazonensis* em 43% a 58% após a TFD.

Além disso, de acordo com estudos de LINARES e colaboradores (2020), clorinas, também avaliadas frente a seu potencial fototóxico *in vitro* frente a *Leishmania*, e que possuem estruturas semelhantes as porfirinas, demonstraram atividade antiparasitária em 24 h ($0,33 \mu\text{M}$) e 48 h ($0,14 \mu\text{M}$) após irradiação a 660 nm ($6,0 \text{ Jcm}^{-2}$). Portanto, compostos contendo o anel pirrolico, como as porfirinas, mostram-se então como bons candidatos para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas utilizando TFD para o tratamento da LC.

Dentre dos FSs utilizados pelo grupo encontram-se as porfirinas, as quais nesta pesquisa, foram avaliadas quanto a seu potencial antileishmanial por meio de TFD. A TFD é uma estratégia promissora de tratamento alternativo, sem ser invasivo, para diversas doenças humanas. Na TFD é necessário o uso de um fotossensibilizador (FS) que se acumule na região alvo, o qual, é ativado pela intensidade apropriada e comprimento de onda da luz, gerando as EROs. Além disso, pode oferecer destruição rápida e localizada das lesões, sem afetar o tecido normal (DĄBROWSKI, 2017).

1.5 Histórico da terapia fotodinâmica e seu mecanismo de ação.

Historicamente, o uso da TFD foi iniciado em 1900 pelo estudante de medicina Oscar Raab. Na época, ele observou que o corante acridina na presença de luz causava rapidamente a inativação do protozoário *Paramecium caudatum*, o que não ocorria com a acridina no

escuro (ACKROYD R; et al 2001). Em 1903, a descoberta realizada por Tappeiner levou à primeira aplicação clínica da TFD. Tappeiner observou a diminuição da massa tumoral depois do uso do corante eosina na presença de luz para o tratamento de câncer de pele. Um ano depois, este mesmo autor utilizou pela primeira vez o termo “ação fotodinâmica” para designar este processo. Meyer-Betz, médico alemão, em 1912 injetou no próprio corpo hematoporfirina, sendo que no momento, ele não verificou nenhum efeito, porém ao entrar em contato com a luz observou que a ação fotossensibilizadora deste corante, devido ao intenso eritema local gerado em seu braço, acabou deixando o seu braço fotossensível por dois meses (MACHADO et al., 2000; RODRIGUES DA SILVA et al., 2009; TOREZAN et al 2009; HERWALDT et al., 1999; LEE et al, 2011).

Em 1925, Policard verificou a produção de efeitos fototóxicos de elevadas concentrações de hematoporfirinas e quando testadas nos tumores malignos na presença de luz e oxigênio se tornavam altamente tóxicas ao tecido celular (MACHADO et al., 2000; RODRIGUES DA SILVA et al., 2009; HERWALDT et al, 1999; LEE et al, 2011).

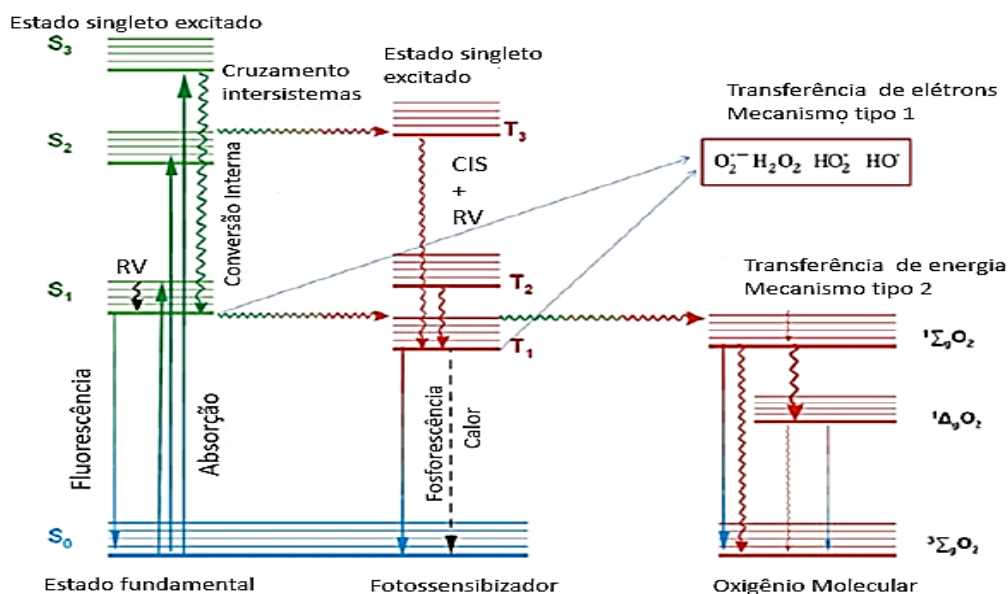
Anos mais tarde, na década de 60, Lipson obteve sucesso no tratamento de câncer mamário ao utilizar derivados de hematoporfirina na presença de luz. No final dos anos 70, a TFD passou a ser reconhecida como uma nova forma de tratamento alternativo para neoplasias (MACHADO et al., 2000; RODRIGUES DA SILVA et al., 2009; PANDEY et al.,1991).

A TFD No Brasil está aprovada desde 2006 para tratamento de câncer de pele não melanoma. A TFD é uma estratégia atualmente utilizada como uma nova modalidade médica terapêutica para o tratamento de diversas doenças oncológicas, cutâneas, carcinoma basocelular, *Mycobacteroides abscessus subsp* e LC (TOREZAN et al, 2009; LEE et al, 2011 BASTOS et al ,2012; VARZANDEH et al, 2021; ROSSI., et al, 2020).

A terapia fotodinâmica é uma técnica muito estratégica e promissora para doenças humanas. A qual possui três componentes importantes: FSs, luz e oxigênio molecular. A TFD é iniciada por meio da excitação de um elétron fotossensibilizador que está em um estado fundamental e passa para o estado singleto excitado. O elétron excitado pode passar por várias vias ou pode voltar para ao estado fundamental inicial em nanossegundos via geração de calor emitindo luz ou fluorescência. O elétron excitado do FS pode gerar cruzamento intersistema onde um estado tripleto excitado de longa duração (microsegundo) é alcançado. Esta técnica obedece a duas rotas principais para geração de EROs. Nas reações do tipo 1, o elétron excitado no estado tripleto é transferido para as biomoléculas (por exemplo, membrana celular) e oxigênio para produzir EROs, como ânions superóxido e radicais hidroxila. Já as reações do tipo 2 interagem diretamente com o oxigênio molecular, produzindo oxigênio

singleto altamente tóxico. As duas reações podem ocorrer simultaneamente como pode-se observar na figura 3 (VITAL et al., 2021; VARZANDEH et al., 2021).

Figura 3 – Processo fotoquímico e fotofísico do FS ilustrado no diagrama de Jablonski modificado para a TFD. O FS no seu estado singleto excitado intersistemas formando um estado tripleto excitado mais estável



Fonte: adaptado de (DABROWSKI et al., 2017)

1.6 Propagação da luz no tecido alvo

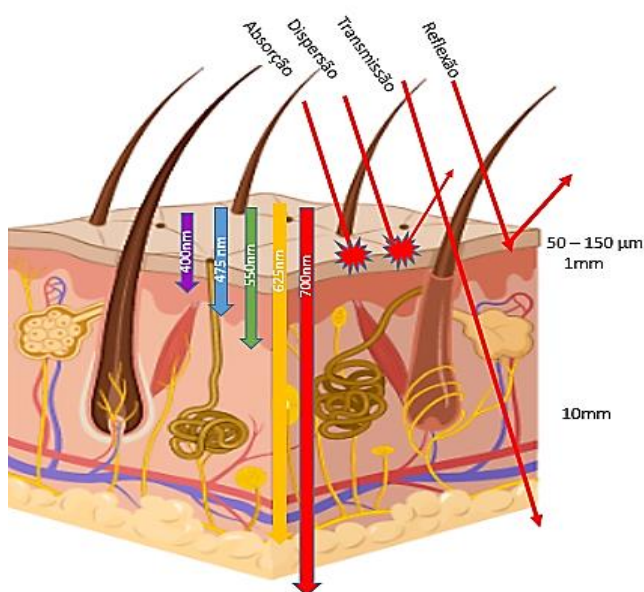
Para que a TFD tenha um melhor desempenho é necessário primeiramente saber o tipo de doença a ser tratada e se existe a biocompatibilidade do FS com o tecido para que a remoção do FS do corpo não tenha nenhum problema. A localização do FS no tecido alvo é interessante saber a espessura seja ele mais fino ou mais grosso é interessante o seu conhecimento pois, quando se aplica TFD em tecido mais profundos existem barreiras que podem dificultar a ação do FS como no caso da profundidade de penetração e a entrega da luz como mostra a figura 4.

Ademais, da dificuldade da absorção, espalhamento, transmissão e reflexão dessa luz. Já no caso do comprimento de onda da luz é necessário saber se esse comprimento consegue penetrar mais profundamente ou menos nos tecidos para que assim se tenha a ativação do FS para geração das EROs no tecido alvo. Outro ponto a ser conhecido seria a eficiência de conversão da luz adequadas para saber se aumenta ou diminui a intensidade da irradiação da

luz e a absorção do FS no tecido além da excitação da sua fluorescência (AGOSTINIS et al., 2011; DABROWSKI et al., 2017; ZHOU et al., 2021).

Diante disso, para o uso da TFD de acordo com o espectro eletromagnético na faixa da luz visível os comprimentos de onda próximos ao azul possuem mais energia quando comparados com o comprimento de luz vermelha, pois estes possuem menor energia e maior penetração de acordo com “janela terapêutica” visto que é nesse intervalo que os FSs que possuem esses comprimentos próximos a luz vermelha conseguem ter uma melhor penetração nos tecidos mais profundos. Comprimentos menores são mais absorvidos por possuírem mais energia, logo são mais absorvidos nas camadas iniciais da pele. Por outro lado, comprimento de onda maiores do espectro da luz vermelha a energia seria insuficiente para dar início a um mecanismo de terapia fotodinâmica por conta dos efeitos térmicos ocasionados pelas transições rápidas não radiativas e por conta do estreito espaço entre os níveis de energia. (DABROWSKI et al., 2017; ZHOU et al., 2021).

Figura 4-Profundidade de luz nos tecidos



Fonte: Adaptado de (DABROWSKI et al., 2017)

1.7 Fotossensibilizadores

A TFD utiliza fotossensibilizadores que atuam nas células alvo, o objetivo crucial é induzir a morte celular por algum mecanismo seja apoptose, necrose e autofagia. Mas para que isso ocorra, é importante a escolha do FS, pois algumas adequações devem ser consideradas em

vista que depende do tipo de tecido que se pretende tratar, das características físico-químicas dos compostos e sua biodistribuição (CLÁUDIA; ISSA; MANELA-AZULAY, 2010); DABROWSKI; ARNAUT et al., 2015).

As características para se ter de um FSs melhor seria a especificidade do tecido alvo, propriedades específicas do tipo de tecido, curto intervalo de tempo entre a administração do FSs ,tempo de meia-vida curto, rápida depuração, ativação por comprimento de onda com ótima penetração no tecido alvo, boa solubilidade em meio fisiológico ,não deve ser toxico nas regiões irradiadas .Além de FSs não deve apresentar toxicidade no tecido na ausência de luz, visto que o objetivo da TFD é que a luz juntamente com FSs haja no tecido alvo. (CLÁUDIA; ISSA; MANELA-AZULAY, 2010); DABROWSKI; ARNAUT et al., 2015). Os primeiros fototerapêuticos utilizados na TFD foram na década de 60 a qual era um novo composto derivado de hemaporfirina (HpD) obtido a partir da purificação dahematoporfirina (Hp) (CLÁUDIA; ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Em meados dos anos 90 a utilização de um composto precursor de FS foi descrito por Kennedy e Pottier, o ácido 5-aminolevulínico (ALA), utilizado como precursor da protoporfirina IX (PpIX), a qual, produzia uma resposta fotodinâmica localizada. Em 2004 a utilização de um metil de ALA o metilaminolevulinato foi aprovado para tratamentos de TFD (MACCORMACK, 2008).

Os fotossensibilizantes são conhecidos em três famílias: FS baseados em porfirinas (p.e. PpIX), FS baseados em clorofila (p.e. clorinas, purpurinas, bacterioclorinas) e corantes (p.e. ftalocianinas) (DAI et al., 2010; FERREIRA et al., 2009).

Por mais que protoporfirinas e os demais FSs sejam muito utilizados na TFD estes compostos possuem várias desvantagens como no caso lenta eliminação do organismo, fazendo com que o paciente apresente reações de fotossensibilidade 6 a 10 semanas após tratamento, tendo assim que evitar a exposição à luz solar ou fontes luminosas artificiais durante este período de tempo, além de ter baixos valores de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) (BELLNIER et al., 2006; YOON; LI; SHIM, 2013).

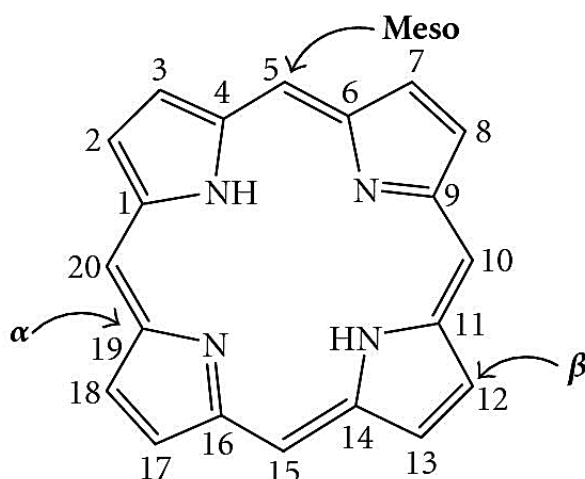
A maioria dos fotossensibilizadores, entre eles as porfirinas halogenadas, clorinas e bacterioclorinas, depois da excitação com a fonte de luz apropriada, produzem uma quantidade suficiente de EROs para provocar a destruição de componentes celulares e vasculares. As EROs ativam a expressão de fatores de transcrição e citocinas, e liberam uma série de mediadores responsáveis pelo processo de morte celular, a qual pode ocorrer tanto por apoptose e/ou necrose. (DABROWSKI et al., 2017).

1.8 Porfirinas

As porfirinas são compostos orgânicos de origem natural que estão envolvidas em uma variedade de processos biológicos importantes, possuem um anel aromático formado por quatro moléculas pirimidil, com um núcleo macrociclo tetrapirrólico com 18 elétrons π , e transições eletrônicas na região do visível com uma forte absorção na região do azul. O quadro fundamental da porfirina consiste em quatro subsédicos pirrólicos ligados em lados opostos (α posições, numeradas 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16 e 19 como mostra a figura 5, através de quatro pontes de metino (CH) (5, 10, 15 e 20), conhecidas como átomos/posições de meso-carbono, (JOSEFSEN; BOYLE, 2008) . Dependendo da modificação do anel e de seus substituintes laterais as porfirinas podem melhorar a suas propriedades espectroscópicas. As porfirinas têm a tendência a se agregar, influenciando assim nas propriedades físico-químicas e espectroscópicas (KEMPA et al.; 2015; GUTERRES et al., 2020). Além disso, estas moléculas são caracterizadas por possuir uma toxicidade moderada *in vitro* e *in vivo* em células humanas, diferente do efeito fototóxico observado em bactérias quando são ativadas pela luz. Estes compostos também tendem a acumular-se rapidamente e manter-se retidos no tecido alvo (ROSSI et al., 2020). Adicionalmente, macrociclos tetrapirrólicos contendo complexos polipiridil coordenados a metais de transição como Pd e Pt incrementam suas atividades fotofísicas, fotoquímicas, e fotobiológicas, o que se vê refletido na melhora de sua atividade fotodinâmica. Além de ter uma alta afinidade por membranas celulares em especial as porfirinas catiônicas (KEMPA et al., 2015; BASTOS et al., 2012; ANDRADE et al., 2018; ROSSI et al., 2020)

De acordo com a literatura, as porfirinas já provaram ser FS eficazes contra diversos microorganismos, incluindo, bactérias, fungos e parasitas (GUTERRES et al. 2019; PÉREZ-LAGUNA et al. 2019; BASSO et al 2019; SOARES LOPES et al., 2019; MOGHNIE et al, 2017; GSPONER; SPESIA; DURANTINI, 2015; LOPERA et al., 2018). Isso porque produzem alta produção de EROs por conta da associação de um FS com o oxigênio molecular e energia luminosa. (BASTOS et al., 2012).

De acordo com COCCA 2020 as porfirinas vinculadas a um grupo redox ligado diretamente ao anel de porfirina ou através do espaçador oferecem um meio para reforçar as interações eletrônicas com moléculas biológicas e no uso em aplicações biomédicas.

Figura 5 – Estrutura da porfirina

Fonte: (JOSEFSEN; BOYLE, 2008)

2.0 Espécies reativas de oxigênio (EROs) e sua atividade leishmanicida

As EROs são os produtos da redução intermediária do oxigênio em meio aquoso o radical superóxido (O_2^-), o oxigênio singleto (O_2), a radical hidroxila (OH), o ânion hidroxila (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e os produtos da reação desses intermediários com haletos e aminas (NATHAN; SHILOH, 2000; FARIA et al., 2005).

Em geral, as EROs são de extrema importância na atividade leishmanicida (WILSON; ANDERSEN; BRITIGAN, 1994; FONSECA-SILVA et al., 2011; KHOURI et al., 2010). No caso a produção intracelular de EROs ocorre quando o parasita é fagocitado sendo a opsonização do parasita por meio dos receptores de membrana, um forte estímulo da sua produção *in vitro*, tanto em macrófagos humanos quanto em macrófagos murinos (ASSECHE et al., 2011; FARIA et al., 2005).

Os efeitos tóxicos diretos do ânion superóxido (O_2^-) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foram demonstrados *in vitro* para a *Leishmania*, pois a suscetibilidade da ROS é dependente do estágio do parasito. As promastigotas metacíclicas foram mais resistentes comparadas com as procíclicas de acordo com a literatura (WILSON et al, 1994; GANTT et al., 2001; ASSECHE et al., 2011). Embora as EROs interfiram na viabilidade da *Leishmania*, este parasita é capaz de desenvolver mecanismo de desintoxicação ao seu favor nas moléculas reativas de oxigênio, utilizando um mecanismo que envolve a síntese de enzimas antioxidantes (GHOSH; GOSWAMI; ADHYA, 2003).

2.1 Colocalização

A captação de FS no tecido alvo ou em outras células é fundamental para a TFD ser eficaz. As EROs têm uma meia-vida curta e atuam perto de seu local de geração. Diante disso, o tipo de fotodano que ocorre em células carregadas com FS e da iluminação depende da localização subcelular precisa do FS dentro da célula. Com microscopia de fluorescência de varredura a laser confocal é possível determinar a localização intracelular do FS muito mais fácil. A colocalização de sondas específicas de organelas subcelulares com diferentes máximos de emissão de fluorescência do FS pode ser usada para identificar mais de perto o local de localização e essas sondas também podem ser usadas para identificar locais de dano ou lesões após a irradiação (GARDNER et al., 2010).

Em *Leishmanias* os FS derivados de porfirinas se acumulam na membrana do parasita, citosol, flagelos e vacúolos endocíticos (LOPERA et al., 2018). Em estudos de PINTO 2016 e colaboradores estudaram a curcumina a qual foi uma alternativa promissora como fotossensibilizadora por não apresentar toxicidade no escuro. E de acordo com as análises de microscopia confocal foi confirmado a internalização da curcumina pelos promastigotas, e os testes de viabilidade do MTT e do azul de Trypan ajudaram a confirmar a eficácia do tratamento com TFD. A morfologia das promastigotas foi altamente afetada pela terapia fotodinâmica. De acordo com esses estudos com FSs distintos a colocalização na *Leishmania* é interessante saber onde os FSs afetam nos parasitas depois da TFD.

2.2 Lisossomos

No ano de 1993, os lisossomos foram pesquisados como um alvo intracelular crítico para a localização de FS. Entretanto, vários estudos foram observados que mesmo FS localizado lisossomicamente pode levar à morte celular após a iluminação isso porque uma vez que os lisossomos são rompidos ocorre a liberação citoplasmática de suas enzimas. A eficácia relativa é significativamente menor do que a observada com FS localizado em mitocôndrias e outras organelas. (KESSEL et al., 1997; CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). Quando se utiliza fármacos neutros ou fracos contendo amina estas se acumulam em compartimentos ácidos intracelulares isso porque a membrana lipossossomal é menos permeável para fármacos de bases protonadas carregadas em comparação com as de bases não carregada este fenômeno é conhecido como “lisossomotropismo”. Dentro dos

lisossomos, esses fármacos tornam-se protonados por conta do baixo pH interno, ocasionando assim a dificuldade desses fármacos saírem do lisossomo (KORNHUBER et al., 2010).

2.3 Mitocôndrias

As mitocôndrias são um alvo subcelular muito importante para muitos FS usados em PDT. Isso porque quando os FS entram em contato com a mitocôndria ocorre o estresse oxidativo por conta das EROs que são capazes de induzir a morte celular imunogênica da célula após a irradiação. Fazendo com que isso atrapalhe a respiração celular e cause danos irreversíveis. Os FS atuam na mitocôndria por conta da polarização de suas membranas que é carregado negativamente em relação ao meio exterior e de sua hidrofobicidade, no caso de moléculas carregadas negativamente. A causa disso é devido à combinação do potencial da membrana mitocondrial é o gradiente de pH produzido por conta do bombeamento de prótons nas proteínas da cadeia respiratória (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007; DABROWSKI et al., 2017).

3 OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a atividade anti-leishmanial *in vitro* e a atividade fototóxica de porfirinas frente a formas de *L. amazonensis*.

3.1 ESPECÍFICOS:

Avaliação fototóxica de porfirinas usando TFD frente a promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, assim como frente a macrófagos peritoneais de camundongo, na presença e ausência de luz branca.

Quanto à investigação dos mecanismos de ação das moléculas em estudo:

Porfirinas usando TFD: Determinação da morte celular induzida na presença e ausência de luz branca após tratamento com o fotossensibilizador que apresentou a melhor atividade anti-leishmanial usando TFD.

Determinação de medida do acúmulo de EROs intracelular.

Determinação da colocalização do FS nas promastigotas.

4. METODOLOGIA

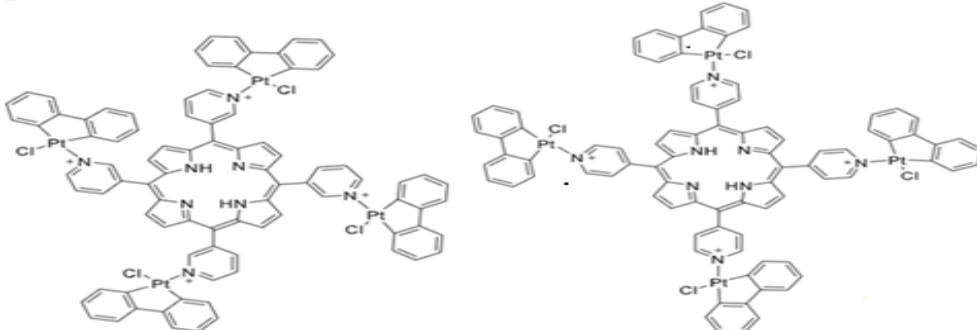
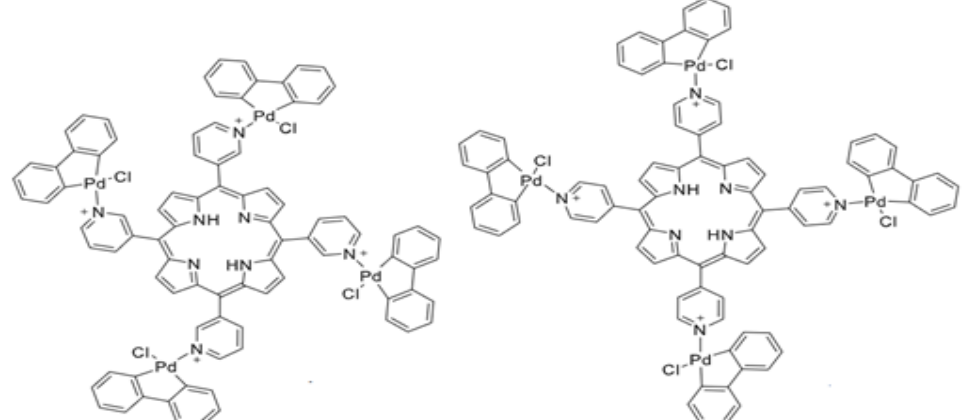
4.1 Cultivo dos parasitas

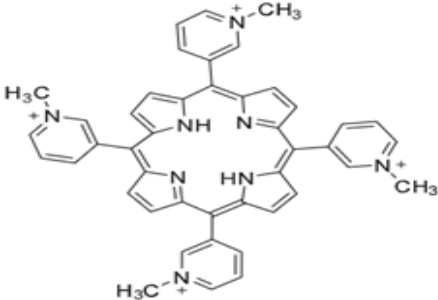
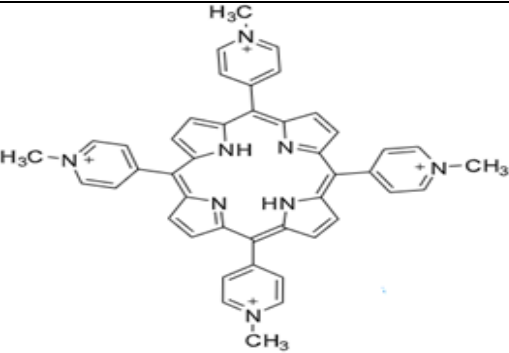
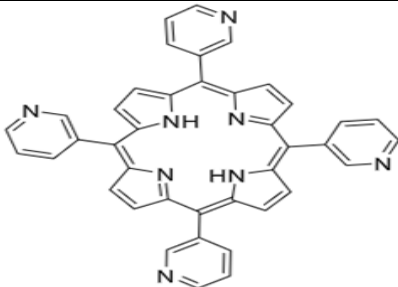
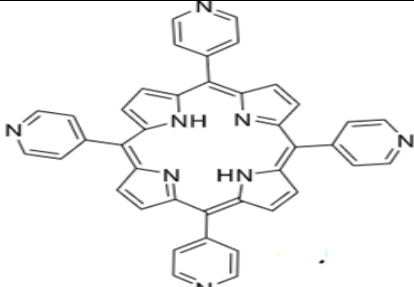
Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MPRO/BR/1972/M1841-LV-79) foram cultivadas em meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (SFBi), 1% de solução de antibióticos estreptomicina/penicilina (10 mg/mL / 10000 µM/mL) em garrafas de 25 cm² (TPP®) à 27°C ± 2, repicadas entre 5 a 8 dias até o momento de uso para os diversos ensaios biológicos.

4.2 Moléculas da classe das porfirinas Estudadas

A síntese das porfirinas foi realizada no Laboratório de Materiais Bioinorgânicos e Porfirínicos da Universidade Federal de Santa Maria a cargo do Prof. Dr. Bernardo Almeida Iglesias, de acordo com metodologia previamente descrita por (ROSSI et al., 2020). Ao total foram sintetizadas 8 moléculas, como apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 -Estrutura das porfirinas com potencial anti-leishmanial utilizadas neste estudo.

Moléculas	ESTRUTURA DAS PORFIRINAS
Porfirinas Catiônicas Tetra platinadas (3-PtTPyP e 4-PtTPyP)	 <p>Chemical Formula: C₈₀H₅₈Cl₄N₁₆Pt₄⁴⁺ Exact Mass: 2162.2353 [3-PtTPyP]</p> <p>Chemical Formula: C₈₀H₅₈Cl₄N₁₆Pt₄⁴⁺ Exact Mass: 2162.2353 [4-PtTPyP]</p>
Porfirinas Catiônicas Tetra Paladadas (3-PdTPyP e 4-PdTPyP)	 <p>Chemical Formula: C₈₀H₅₈Cl₄F₂₄N₁₆P₄Pd₄⁴⁺ Exact Mass: 2390.7840 [3-PdTPyP]</p> <p>Chemical Formula: C₈₀H₅₈Cl₄F₂₄N₁₆P₄Pd₄⁴⁺ Exact Mass: 2162.2353 [4-PdTPyP]</p>

<p>Porfirina Catiônicas Tetra Metiladas (3-TMePyP e 4-TMePyP)</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{44}H_{38}N_8^{4+}$ Exact Mass: 818,1974 [3-TMePyP]</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{44}H_{38}N_8^{4+}$ Exact Mass: 1185,9398 [4-TMePyP]</p>
<p>Porfirina neutra Tetra Pirimidil (3-TPyP e 4-TPyP)</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{40}H_{26}N_8$ Exact Mass: 618,2280 [3-TPyP]</p>	 <p>Chemical Formula: $C_{40}H_{26}N_8$ Exact Mass: 618,2280 [4-TPyP]</p>

4.3 Avaliação da captação - das Porfirinas em *Leishmania amazonensis*

Para avaliar a captação dos diferentes FS, 5 mL da cultura de promastigotas de *L. amazonensis* a uma concentração de 1×10^7 parasitas/mL cultivadas em meio LIT foram colocados em tubos falcons com diferentes concentrações dos compostos porfirínicos (100 a 1 nM) ao abrigo da luz sobre agitação constante (agitador de oscilação gangorra) a 27° C em diferentes tempos (1h, 3h, 6h, 12h e 24h). Em seguida, as células foram centrifugadas e lavadas, o sobrenadante foi descartado para eliminar o excesso de FS e ressuspensionado em 1 mL de PBS 1X. Em seguida, 200 μ L da cultura celular foram distribuídas em triplicata em placas pretas de fundo claro de 96 poços. O PBS foi utilizado como controle. A leitura da fluorescência foi feita utilizando o leitor de placa TECAN (INFINITE pro 200), a 415 nm de excitação e 650 nm de emissão. Gráficos de tempo vs. intensidade de fluorescência foram realizados para todos os compostos para determinar o pico máximo de fluorescência (maior acumulação dos compostos ao interior celular), determinando assim o tempo necessário para a internalização das porfirinas através da membrana dos parasitas. Este ensaio está baseado em metodologia previamente estabelecida por LINARES et al., 2020; MANZANO et al 2011.

4.4 Atividade anti-promastigota

Em resumo 1×10^7 parasitas/mL de formas promastigotas de *L. amazonensis* foram utilizadas para a avaliação da atividade anti-leishmanial de acordo com metodologia previamente descrita (VELASQUEZ et al., 2017; VELASQUEZ et al., 2021). Em resumo, 97 μL de promastigotas na fase logarítmica foram colocadas em placas de 96 poços (TPP®) e tratadas com diferentes concentrações dos FSs (0,1 nM a 5000 nM) em estudo, previamente solubilizados em DMSO (a concentração final de DMSO nos ensaios foi de 3%) e adicionados à suspensão de parasitas. Em seguida foram deixados os compostos por 12 h para sua acumulação intracelular, seguida da irradiação com Led Branco ($40\text{mW}/\text{Cm}^2$) por 30 min e 60 min utilizando um Biotable. Posteriormente foram protegidas da luz e postas para incubar por 48 h a $27^\circ\text{C} \pm 2$.

O mesmo ensaio foi realizado com promastigotas na ausência de irradiação e na presença dos FSs. Após incubação das placas, foi adicionado 10 μL de uma solução de MTT 6 mM / PMS 0,7 mM, seguido por nova incubação por 75 minutos ao abrigo da luz para a redução dos cristais de formazan por enzimas mitocondriais de células viáveis. Finalmente, para solubilização dos cristais de formazan, foi adicionada uma mistura de PBS/Isopropanol (1:1) e a leitura da absorbância foi realizada a 570 nm em espectrofotômetro UV-visível (Tecan®). Por meio de regressão não linear foi determinado o valor da concentração efetiva ao 50% ($\text{EC}_{50\text{-PRO}}$) utilizando o software Bioestat®. Os dados foram expressos como média \pm DP de triplicata independentes. Para o cálculo das doses utilizadas nos ensaios usando TFD, utilizou-se a seguinte equação:

$$\text{Irradiância} = \frac{40 \text{ mw}(\text{Potência do led})}{\text{Cm}^2} = 0,04 \times \frac{\text{Watts}}{\text{Cm}^2}$$

Onde, 1 watts = $\frac{1\text{J}}{\text{s}} = 1 \text{ J} = \text{W} \cdot \text{s}$

Tempo de iluminação : 1800 s e 3600 s

Dose de luz : Irradiância x tempo = $(0,04 \times \frac{\text{Watts}}{\text{Cm}^2}) \times (1800 \text{ s})$

Dose : $72 \frac{\text{Watts}}{\text{Cm}^2} = 72 \frac{\text{J}}{\text{Cm}^2}$

Dose de luz : Irradiância x tempo = $(0,04 \times \frac{\text{Watts}}{\text{Cm}^2}) \times (3200 \text{ s})$

Dose : $144 \frac{\text{Watts}}{\text{Cm}^2} = 144 \frac{\text{J}}{\text{Cm}^2}$

4.5 Avaliação da Foto-citotoxicidade

Macrófagos peritoneais de camundongo de machos *Swiss* entre 6 a 8 semanas foram extraídos seguindo os protocolos previamente estabelecidos (VELASQUEZ et al., 2016, 2017) e aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, sob o protocolo CEUA/FCF/CAR: 11/2021 (Apendice pag 78). Após a extração, as células foram ressuspensas em meio RPMI suplementado com 10% SFB e 1% de solução de antibióticos estreptomicina/ penicilina.

Após contagem diferencial utilizando azul de tripan em câmara de Neubauer, 5×10^5 macrófagos/mL foram transferidos a placas de 96 poços e incubadas a 37 °C em estufa com 5% CO₂ por 6 h para aderência dos macrófagos. Após esse período, o meio foi renovado e tanto os FSs como o fármaco de referência (Anf B) foram adicionados em diversas concentrações e incubados por 12h a 37°C em estufa com 5% CO₂, para garantir a acumulação dos compostos ao interior das células antes do processo de irradiação. Para o processo de irradiação, utilizaram-se as mesmas doses de luz 72 J/cm² e 144 J/cm², usando Led Branco como descrito na avaliação da atividade anti-promastigota. Posteriormente as placas foram protegidas da luz e postas para incubar por 24 h a a 37 °C / 5% CO₂. A determinação de macrófagos viáveis foi realizada usando o ensaio colorimétrico de MTT de acordo com metodologia previamente estabelecida (VELASQUEZ et al., 2016, 2017; LINARES et al., 2020). Os resultados foram expressos como CC₅₀ e realizados por regressão não linear utilizando-se o software Bioestat ®. Os dados foram expressos como média ± DP de triplicatas independentes e os gráficos foram feitos no Prism – GraphPad.

4.6 Atividade anti- amastigota

Para a avaliação da atividade antiparasitária contra as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* seguiu-se a metodologia previamente estabelecida por (VELÁSQUEZ et al., 2016, 2017; LINARES et al., 2020). Em resumo, macrófagos peritoneais de camundongo de machos foram ressuspensos em meio RPMI suplementado com 10% SFB e 1% de solução de antibióticos estreptomicina/ penicilina, e após contagem diferencial utilizando azul de tripan em câmara de Neubauer, 5×10^5 macrófagos/mL foram transferidos a placas de 24 poços com lamínulas circulares e incubadas a 37 °C em estufa com 5% CO₂ por 6 horas para aderência dos macrófagos. Após esse período, 1×10^7 promastigotas/mL de *L. amazonensis* foram utilizadas numa proporção de 5 parasitas para 1 macrófago, por 8 horas para o processo de infecção. Seguidamente, o meio foi renovado e tanto os FSs como o fármaco de referência foram adicionados em diversas concentrações e

incubados por 12 h a 37 °C/ 5% CO₂, para garantir a acumulação dos compostos ao interior das células antes do processo de irradiação. Para o processo de irradiação, utilizou-se uma dose de luz de 72 J/cm², usando Led Branco como descrito na avaliação da atividade anti-promastigota. Posteriormente as placas foram protegidas da luz e postas para incubar por 24 h a 37 °C / 5% CO₂. Depois do período de incubação, as lamínulas, contendo o material celular, foram fixadas com metanol, coradas com *Giemsa* e removidas das placas para observação em microscopia óptica comum e contagem do número de amastigotas intracelulares em cada 100 macrófago (PASSALACQUA et al., 2015; VELÁSQUEZ et al., 2016). Por meio de regressão não linear foi determinado o valor da concentração efetiva ao 50% (EC_{50-AMA}) utilizando o software Bioestat®. Os dados foram expressos como média ± DP de triplicatas independentes.

4.7 Cálculo do Índice de seletividade (IS)

Os cálculos foram baseados de acordo com os resultados de citotoxicidade dos macrófagos peritoneais de camundongo (CC₅₀) e da atividade antileishmanial (EC₅₀), a relação CC₅₀/EC₅₀ foi utilizada para determinar o índice de seletividade (IS) (BOLLINI et al., 2009). Índices com valores superiores a 10 sugerem que o uso do composto pode ser considerado seguro (PASSERINI et al., 2008).

4.8 Medida do acúmulo de EROs intracelular (¹O₂)

Promastigotas na fase mid log (1 x 10⁷ parasitas/mL) de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio LIT, centrifugadas e ressuspensas em meio HBSS. Placas de 24 poços foram utilizadas para incubar 2mL de parasitas com os FSs numa concentração final de 125 nM por 12 h. Passado o período de incubação os parasitas foram centrifugados por 2000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente e ressuspensos em 1mL de meio HBSS, em seguida, 10 µL da sonda H₂DCFDA (2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, sigma) foram adicionados e os parasitas foram deixados em incubação ao abrigo de luz por 25 min sob agitação constante a 27°C, seguido do processo de irradiação com luz branca a uma dose de 72 J/cm². Em seguida, 200 µL das amostras foram postas em placas pretas e lidas em espectrofotômetro (Tecan) a 480/ 530 nm. Para os brancos foi utilizado o FS + 1mL de HBSS sem irradiação. Como controle, parasitas na presença e ausência de luz branca sem os FSs foram utilizadas. Os dados foram expressos como média ± DP de triplicatas independentes e os gráficos foram feitos no Prism – GraphPad.

4.9 Colococalização

Em resumo 1×10^7 promastigotas/mL de *L. amazonensis* foram cultivadas em meio de cultura livre de SFB e incubadas por 12 h com 125 nM de cada FSs. Após este período, os parasitas foram centrifugados por 10 min a 2000 xg e, em seguida, o pellet foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura livre de SFB com LysoTracker™ Green DND-26 (75 nmol/L) por 90 min. Do mesmo modo, um experimento semelhante foi realizado utilizando o marcador MitoTracker™ Orange CM-H2TMros (M7511) (200 nmol/L) por 90 min. Em seguida, os parasitas foram centrifugados, lavados com PBS e ressuspenso em 100 µL de meio fresco pré-aquecido livre de SFB. Os parasitas foram imobilizados em lamínula de vidro previamente tratada com 1 µL de Corning® Cell-Tak™ para posterior aquisição das imagens por microscopia de fluorescência confocal (Carl Zeiss LSM 800) com aumento de 40x. A fluorescência de MitoTracker™ Orange e LysoTracker™ Green foi capturada em 554/576 nm e 504/511 nm, respectivamente, e a dos fotossensibilizadores a 415 nm excitação/ 650 nm emissão.

4.10 Avaliação do tipo de mecanismo de morte potencialmente induzido por Porfirinas usando TFD utilizando a coloração de brometo de etídio/laranja de acridina (BE/LA)

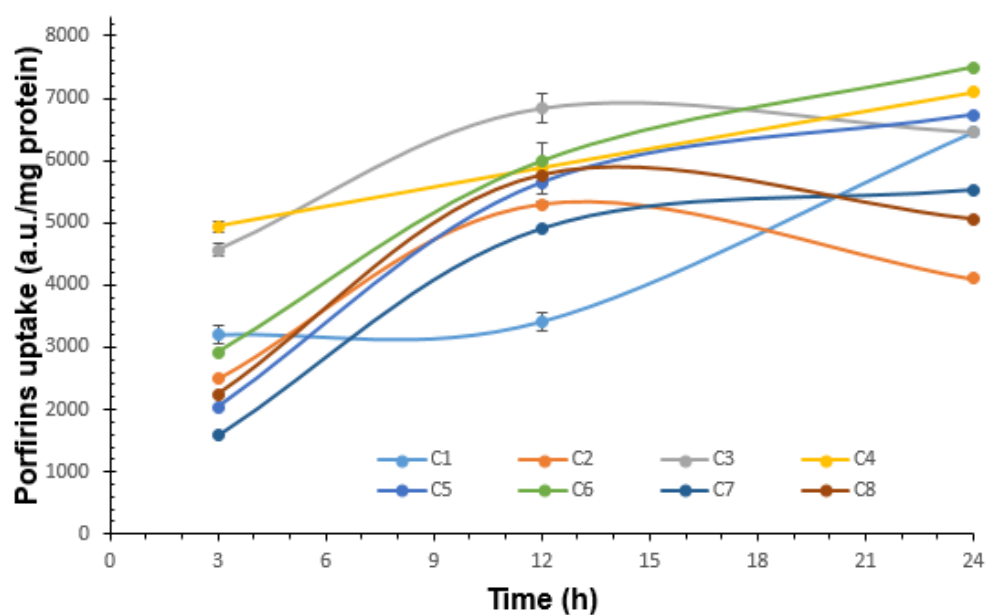
Para as porfirinas que obtiveram os melhores EC_{50-PRO} e índice de seletividade (3PdTPyP, 3PtTyP e 3TPyP), e seus isômeros (4PdTPyP, 4PtTyP e 4TPyP) foi avaliado o mecanismo de morte celular induzido frente a *L. amazonensis* usando TFD. Em resumo, promastigotas de *L. amazonensis* na fase de med log (1×10^7 parasitas/mL) foram incubados por 12 h com os FSs (125 nM) e posteriormente centrifugados por 10 min a 2000 xg, lavados com PBS e irradiados com luz branca a uma dose de luz de 72 J/cm^2 . 6 h e 24 h após irradiação, os parasitas foram centrifugados e ressuspendidos em 100 µL de PBS, seguida da adição de 2 µL da mistura de BE/LA (1 mg/mL) e imobilizados em uma lâmina de vidro previamente tratada com Cell-Tak™. Os parasitas marcados foram visualizados por microscopia de fluorescência (Carl Zeiss LSM 800) com aumento de 40x. Para quantificar a porcentagem de cada evento foram contadas 200 células de cada amostra. Onde as células viáveis foram visualizadas de color verde, as células necróticas em vermelho e as células apoptóticas em amarelo/laranja.

5.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação da acumulação de Porfirinas em promastigotas de *L. amazonensis*

Com o objetivo de verificar a internalização das porfirinas em promastigotas de *L. amazonensis*, os parasitas foram tratados com diferentes concentrações dos FSs para determinar a melhor concentração na qual não se formaram agregados e observará-se o melhor espectro de fluorescência, sendo que na concentração de 150 nM acharam-se os parâmetros ideais para realizar o ensaio de acumulação das porfirinas. Seguidamente, os FSs foram adicionados a uma cultura de *L. amazonensis* como descrito em materiais e métodos, sempre eliminando o excesso do FS não interiorizado, e incubados em diferentes tempos para determinar o tempo apropriado de acumulação, como observa-se na figura 6. A intensidade de fluorescência observada nos diferentes tempos analisados demonstrou que com 12 h e 24 h apresentou-se a maior emissão de fluorescência na maioria dos compostos, o que sugere que a maioria das porfirinas conseguiram penetrar a membrana plasmática do parasita neste período de tempo.

Figura 6 - Avaliação da acumulação das Porfirinas em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Sendo: C1 e C4 (4-PtTPyP, 3-PtTPyP), C2 e C6 (4-TPyP, 3-TPyP), C3 e C7 (3-PdTPyP e 4-PdTPyP), C5 e C8 (4-TMePyP, 3-TMePyP).



5.2 Avaliação da atividade anti-leishmanial de Porfirinas frente a *Leishmania* usando TFD

A proliferação celular de promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* expostas a diferentes concentrações das porfirinas por 12h, na presença (72 e 144 J/cm², correspondente a 30 e 60 min de irradiação, respectivamente) e ausência de luz branca (Escuro), foi avaliada após 48h de irradiação e o valor de EC₅₀ foi determinado, Tabela 2.

Tabela 2 Atividade fototóxica (EC₅₀) e foto-citotóxica (CC₅₀) *in vitro* de porfirinas frente às formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* e macrófagos murinos por meio de TFD, respectivamente. NA: não apresentou atividade na máxima concentração testada (5000 nM). Promastigotas e amastigotas de *Leishmania* e macrófagos peritoneais de camundongo foram incubados por 12 h utilizando diferentes concentrações dos compostos, seguidos da irradiação com Led branco 72 J/cm² e 144 J/cm². Os parasitas foram irradiados por 30 e 60 min, enquanto os macrófagos peritoneais por 30 min.

Porfirinas	EC ₅₀ -PRO 72 J/cm ² (nM)	EC ₅₀ -PRO 144 J/cm ² (nM)	EC ₅₀ -AMA 72 J/cm ² (nM)	CC ₅₀ 72 J/cm ² (nM)
4-PtTPyP	597,0 ± 31,4 (3,3)	405 ± 35	331,3 ± 4,5 (6)	1950 ± 50
3-PtTPyP	8,7 ± 0,4 (213)	30,5 ± 7,5	27,6 ± 6,7 (67)	1850 ± 150
4-TPyP	3335 ± 1665 (0,6)	3700 ± 1000	-	1940 ± 60
3-TPyP	25,5 ± 7,5 (62)	9 ± 1	47,9 ± 4,4 (33)	1580 ± 15
4-PdTPyP	49,7 ± 19,5 (>100)	51 ± 12	426,3 ± 6,8 (>12)	NA
3-PdTPyP	15 ± 5 (85,3)	20 ± 1	38,8 ± 11,5 (33)	1280 ± 580
4-TMePyP	48,75 ± 95	365 ± 765	NA	NA
3-TMePyP	3360 ± 1260	1420 ± 320	NA	NA
Anf B (sem irradiação)	3200 ± 100 (7,2)	—	4920 ± 140 (4,7)	23100 ± 2500

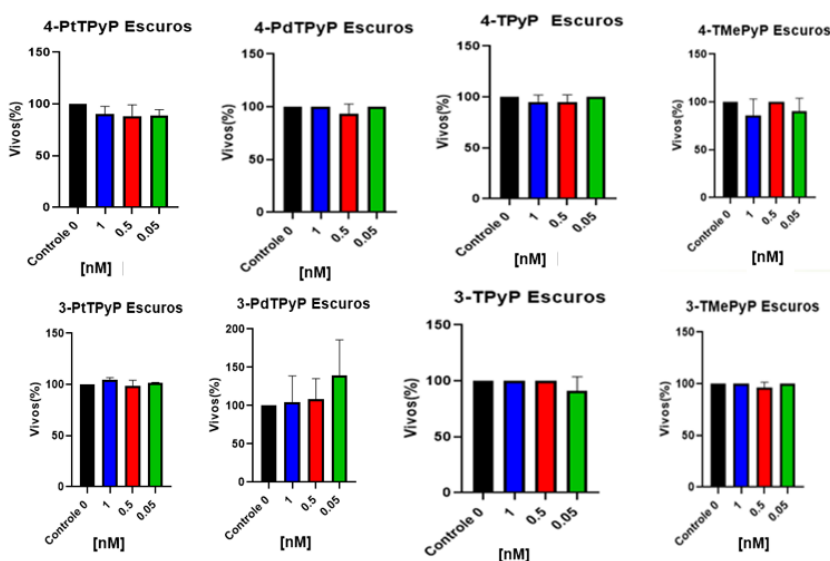
Os valores são expressos como média ± DP em nM. Valores em negrito fazem referência ao valor do índice de seletividade (**IS**).

Na ausência de irradiação nenhuma diminuição na porcentagem de promastigotas viáveis foi observada (Figura 7) contudo, após a aplicação da TFD, as porfirinas demonstraram efeito fototóxico frente aos parasitas em ambas as doses de luz avaliadas (72 e 144 J/cm²), como observado nas figuras 8, 9, 10 e 11.

Promastigotas tratados com as porfirinas catiônicas tetra platinadas e tetra paladadas (**4-PtTPyP**, **3-PtTPyP**, **4-PdTPyP**, **3-PdTPyP**) correspondentes as Figuras 8 e 9, respectivamente, apresentaram uma notável redução da porcentagem de células viáveis ($\geq 80\%$) após irradiação na maior concentração testada ($1\mu\text{M}$). Com tudo, um favorecimento da atividade fototóxica foi observado nas porfirinas substituídas na posição 3 (posição meta). De igual forma, as porfirinas neutras tetra-piridil (**4-TPyP**, **3-TPyP**), Figura 10, apresentaram o mesmo perfil de atividade fototóxica frente às formas promastigotas de *Leishmania*.

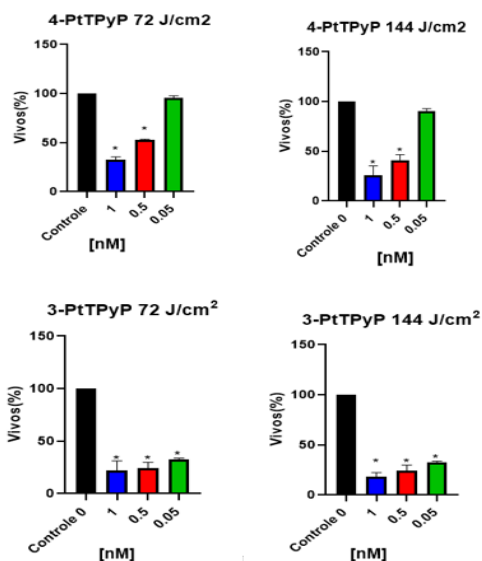
O efeito fototóxico das porfirinas frente às formas promastigotas de *Leishmania* usando a dose de luz de 72 J/cm^2 apresentou a seguinte ordem de atividade anti-leishmanial de acordo com os valores reportados na tabela 2: **3-PtTPyP** > **3-PdTPyP** > **3-TPyP** > **4-PdTPyP** > **4-PtTPyP** > **4-TPyP** > **3-TMePyP** > **4-TMePyP**. Entretanto, ao incrementar a dose de luz (144 J/cm^2), observa-se uma mudança na ordem de atividade como segue: **3-TPyP** > **3-PdTPyP** > **3-PtTPyP** > **4-PdTPyP** > **4-TMePyP** > **4-PtTPyP** > **3-TMePyP** > **4-TPyP**. Em ambos os casos, as porfirinas tetra-paladadas (**PdTPyP**), tetra-platinadas (**PdTPyP**) e a porfirina neutra (**TPyP**) substituídas na posição meta, mostram serem as moléculas com maior potencial antileishmanial frente às formas promastigotas do parasito.

Figura 7- Avaliação da proliferação celular de *L. amazonensis* Porfirinas Catiônicas tetra platinadas (**4-PtTPyP** e **3-PtTPyP**), Porfirinas catiônicas de paládio (**4-PdTPyP** e **3-PdTPyP**), Porfirinas neutras pirimidil (**4-TPyP** e **3-TPyP**) e Porfirinas tetra metiladas (**4-TMePyP** e **3-TMePyP**) na ausência de luz branca (escuro). O controle corresponde às formas promastigotas de *Leishmania* na ausência de FS.



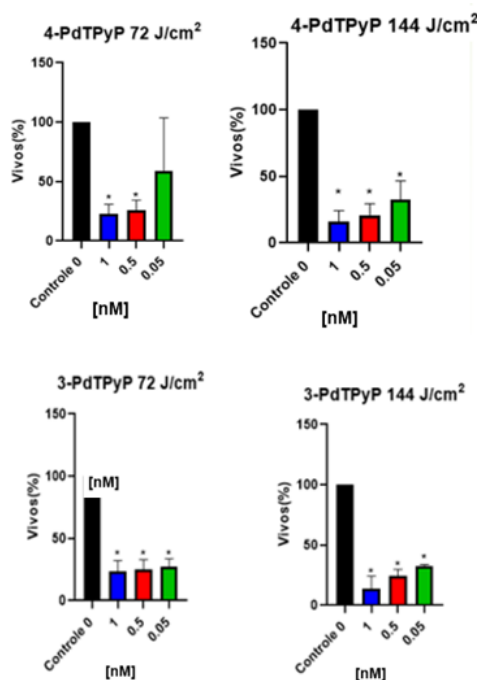
Os dados foram expressos como a média \pm DP. *: diferença estatisticamente significativa relativa ao controle ($P < 0,01$)

Figura 8- Avaliação da proliferação celular de *L. amazonensis* na presença de Porfirinas Catiônicas tetra platinadas (**4-PtTPyP** e **3-PtTPyP**) usando TFD na presença (72 J/cm² e 144 J/cm²). O controle corresponde às formas promastigotas de *Leishmania* na ausência de FS ao controle (P< 0,01).



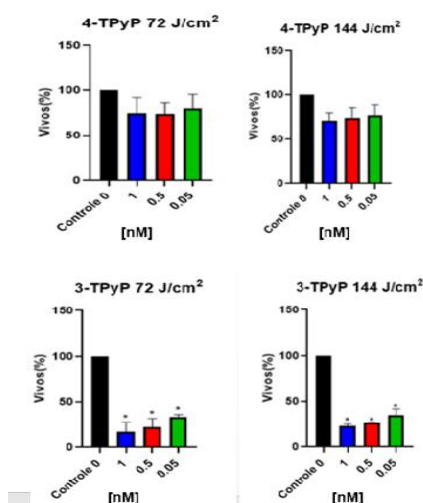
Os dados foram expressos como a média \pm DP. *: diferença estatisticamente significativa relativa

Figura 9 – Avaliação da proliferação celular de *L. amazonensis* na presença de Porfirinas Catiônicas tetra paladadas (**4-PdTPyP** e **3-PdTPyP**) usando TFD na presença (72 J/cm² e 144 J/cm²). O controle corresponde às formas promastigotas de *Leishmania* na ausência de FS.



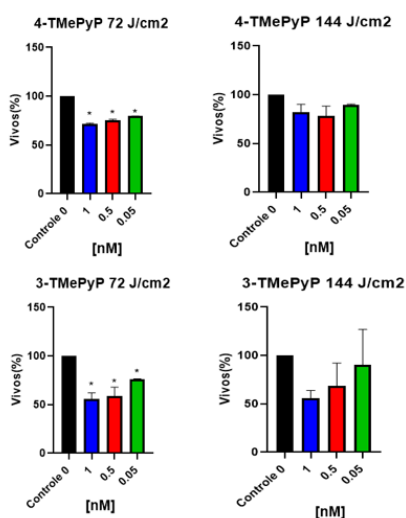
Os dados foram expressos como a média \pm DP. *: diferença estatisticamente significativa relativa ao controle (P< 0,01).

Figura 10 - Avaliação da proliferação celular de *L. amazonensis* na presença de Porfirinas Catiônicas neutra pirimidil (**4-TPyP** e **3-TPyP**) usando TFD na presença (72 J/cm² e 144 J/cm²). O controle corresponde às formas promastigotas de *Leishmania* na ausência de FS.



Os dados foram expressos como a média \pm DP. *: diferença estatisticamente significativa relativa ao controle ($P < 0,01$).

Figura- 11 Avaliação da proliferação celular de *L. amazonensis* na presença de Porfirinas Catiônicas tetra metiladas (**4-TMeTPyP** e **3-TMeTPyP**) usando TFD na presença (72 J/cm² e 144 J/cm²). O controle corresponde às formas promastigotas de *Leishmania* na ausência de FS.



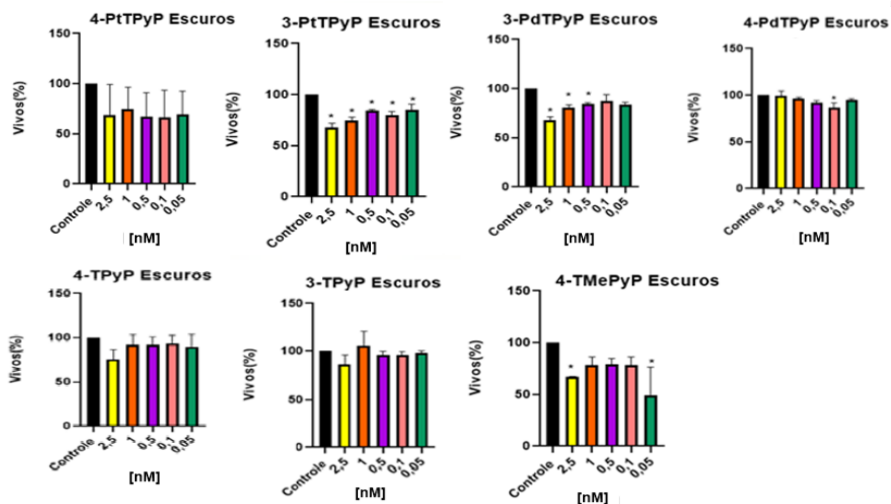
Os dados foram expressos como a média \pm DP. *: diferença estatisticamente significativa relativa ao controle ($P < 0,01$).

Em geral, estes FS não se mostraram tóxicos quando testados em macrófagos peritoneais de camundongo, sendo que as moléculas **3-PtTPyP** (IS: 213), **3-PdTPyP** (IS:85,2) e **3-TPyP** (IS: 61,9) demonstraram maior seletividade frente às promastigotas.

O efeito observado sobre a viabilidade celular produzido pelos FSs utilizando TFD depende do tipo de célula, da concentração de oxigênio, e do tipo e quantidade de FS armazenado dentro da célula, assim como também, da dose de luz aplicada e do seu comprimento de onda (Allegra et al., 2020). Como visto no caso das formas promastigotas, um aumento na dose de luz, baixo as mesmas condições experimentais, influencia no potencial antileishmanial das porfirinas e demonstra uma mudança na sua ordem de atividade. De maneira similar realizou-se a avaliação do efeito foto-citotóxico destas porfirinas usando as mesmas doses de luz frente a macrófagos peritoneais de camundongo. Contudo, na dose de 144 J/cm^2 , na ausência dos FSs, os macrófagos sofreram sérios danos na sua membrana celular o que se viu refletido na porcentagem de células viáveis ao usar o método colorimétrico de MTT (só 20% das células foram viáveis na presença da luz branca). Por tanto, os ensaios em macrófagos murinos foram realizados utilizando só a dose de 72 J/cm^2 , onde na ausência dos FSs, nenhuma alteração foi observada e encontrou-se mais de 95% de células viáveis após irradiação.

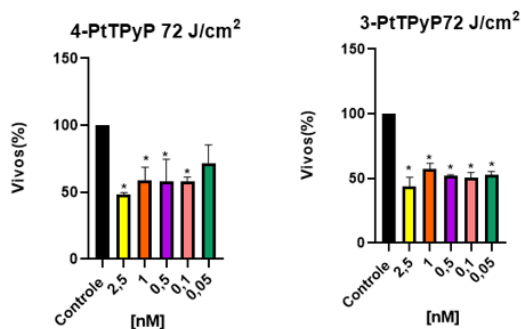
Nas figuras 12, 13, 14, 15 e 16 observa-se o efeito foto-citotóxico (CC_{50} , Tabela 2) das porfirinas frente a macrófagos intraperitoneais de camundongo na ausência e presença de luz branca. Na figura 12 observa-se que na ausência de irradiação (escuros) se apresenta uma redução na porcentagem de células viáveis de 20%, que na maioria dos casos, não é estatisticamente significativa quando comparado com as células que não foram incubadas com o FS (controle). Entretanto, igual ao observado frente às promastigotas de *Leishmania*, após aplicação da TFD, as porfirinas incrementaram seu efeito foto-citotóxico nas maiores concentrações testadas (2,5 e $1 \mu\text{M}$). Contudo, uma menor porcentagem de células viu-se afetada pelo efeito conjugado entre o FS e o processo de irradiação com led branco ($\leq 50\%$). Em geral, estes FS se mostraram um pouco tóxicos quando testados frente a macrófagos peritoneais de camundongo na presença de luz branca (72 J/cm^2) como reportado na tabela 2, o que seria essencial no tratamento de pacientes com LC.

Figura 12- Avaliação da viabilidade celular frente a macrófagos murinos de porfirinas catiônicas tetra platinadas (**4-PtTPyP** e **3-PtTPyP**), porfirinas catiônicas de paládio (**4-PdTPyP** e **3-PdTPyP**), porfirinas neutras pirimidil (**4-TPyP** e **3-TPyP**) e porfirinas tetra metiladas (**4-TMePyP**) na ausência de luz branca (escuros). O controle corresponde às formas promastigotas de *Leishmania* na ausência de FS.



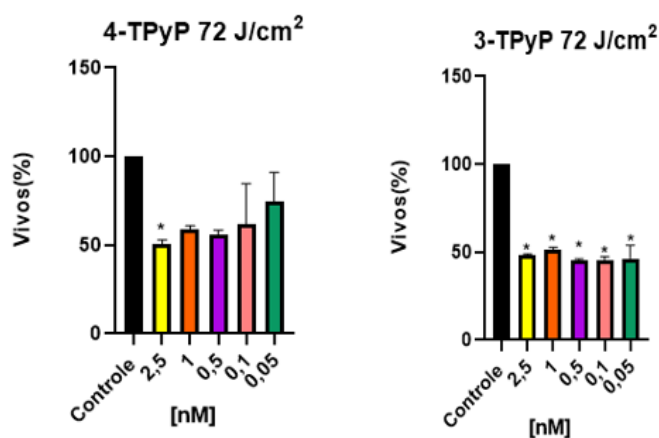
Os dados foram expressos como a média \pm DP. *: diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (P < 0,05).

Figura 13- Avaliação do efeito foto-citotóxico de porfirinas catiônicas tetra platinadas, **3-PtTPyP** e **4-PtTPyP**, frente a macrófagos peritoneais de camundongo usando TFD na presença (72 J/cm^2). O controle corresponde aos macrófagos intraperitoneais na ausência de FS.



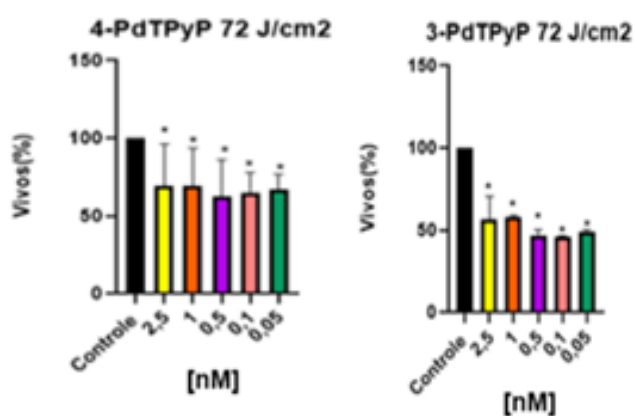
Os dados foram expressos como a média \pm DP. *: diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (P < 0,05).

Figura 14 – Avaliação do efeito foto-citotóxico de porfirinas Neutras -piridil, **3-TPyP**, **4-TPyP** frente a macrófagos peritoneais de camundongo usando TFD na presença de luz branca (72 J/cm²). O controle corresponde aos macrófagos intraperitoneais na ausência de FS.



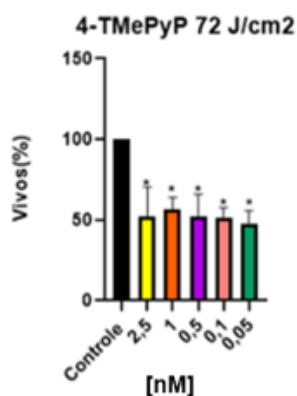
Os dados foram expressos como a média \pm DP. *: diferença estatisticamente significativa relativa ao controle ($P < 0,05$).

Figura 15- Avaliação do efeito foto-citotóxico de porfirinas catiônicas tetra paladadas, **4-PdTPyP** e **3-PdTPyP** frente a macrófagos peritoneais de camundongo usando TFD na presença de luz branca (72 J/cm²). O controle corresponde aos macrófagos intraperitoneais na ausência de FS.



Os dados foram expressos como a média \pm DP. *: diferença estatisticamente significativa relativa ao controle ($P < 0,05$).

Figura 16- Avaliação do efeito foto-citotóxico de porfirina catiônica tetra Metilada **4-TMePyP** frente a macrófagos peritoneais de camundongo usando TFD na presença de luz branca (72 J/cm²). O controle corresponde aos macrófagos intraperitoneais na ausência de FS.



Os dados foram expressos como a média \pm DP. *: diferença estatisticamente significativa relativa ao controle ($P < 0,05$).

Devido a que o aumento na dose de luz mostrou um efeito foto-citotóxico frente a macrófagos murinos, a avaliação da atividade antileishmanial dos FSs frente as formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* foi realizado utilizando a dose de luz de 72 J/cm².

As moléculas **3-PtTPyP**, **4-PtTPyP**, **3-PdTPyP**, **4-PdTPyP** e **3-TPyP** que demonstraram a melhor atividade anti-promastigota na presença de luz foram utilizadas nos ensaios de amastigota intracelular e os valores de suas atividades encontram-se reportados na tabela 2 ($EC_{50} -AMA$). Adicionalmente, usando os valores de EC_{50} e CC_{50} foi determinado o valor do índice de seletividade (IS) de cada uma das porfirinas utilizadas neste estudo (tabela 2). Sendo que o efeito fototóxico das porfirinas frente às formas amastigotas do parasita, que são as formas clinicamente relevantes, apresentaram a seguinte ordem de atividade anti-amastigota ao serem irradiadas com uma dose de luz branca de 72 J/cm²: **3-PtTPyP** > **3-PdTPyP** > **3-TPyP** > **4-PtTPyP** > **4-PdTPyP**. O anterior mostra que as porfirinas **3-PtTPyP**, **3-PdTPyP** e **3-TPyP** são as moléculas com melhor potencial para serem utilizadas no tratamento da LC, pois em ambas as formas do parasita (promastigotas e amastigotas) apresentaram os melhores valores de atividade anti-leishmanial (Tabela 2), mostrando novamente que a substituição na posição 3 (*meso*) neste tipo de porfirinas potencializa a ação fotodinâmica observada, similar ao reportado por Rossi e colaboradores (2020) em diferentes espécies de *Mycobacterium*. Comparando a atividade fotodinâmica reportada destas porfirinas

tetra-catiônicas com uma potência cerca de 100 vezes superior ao encontrado com o fármaco de referência Anf B (EC_{50-PRO} : 3200 nM; EC_{50-AMA} : 4920 nM), corrobora-se o grande potencial de aplicação destas moléculas para o tratamento da LC.

Por outro lado, se observarmos os valores de seletividade encontrados para estas moléculas (IS em negrito, Tabela 2) evidencia-se que a porfirina tetra-catiônica **3-PtTPyP** é a mais seletiva frente às formas amastigotas intracelulares do parasita, que são as formas presentes no hospedeiro mamífero. Seguem em termos de seletividade as porfirinas **3-PdTPyP = 3-TPyP > 4-PdTPyP**, o que faz destas porfirinas ótimos candidatos para serem futuramente testados em modelos animais para avaliar sua eficácia *in vivo* por meio de TFD como alternativa terapêutica para o tratamento da LC.

5.3 Mecanismo de ação das porfirinas frente a *Leishmania* por medio de TFD

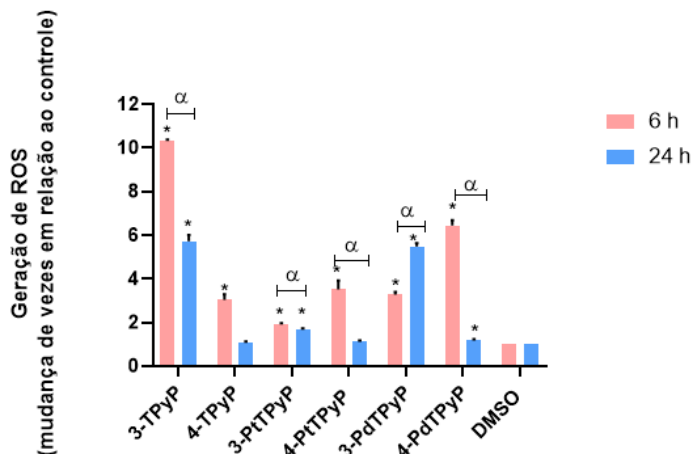
Devido ao fato de que a alta fotoatividade reportada para os derivados de Pt (II) e Pd (II) de porfirinas tetra catiônicas está diretamente associado com suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, realizou-se a medida do acúmulo de EROs utilizando a sonda H₂DCFDA (2',7'-diacetato de diclorofluoresceína) induzido pelo tratamento com as porfirinas frente a *Leishmania* após irradiação (72J/cm²). A sonda H₂DCFDA detecta a produção do ânion radical superóxido (O₂^{•-}), o peróxido de hidrógeno (H₂O₂), o dióxigênio singlete (¹O₂) e o radical hidroxila (HO[•]), os quais estão relacionados com as reações do Tipo I na TFD.

De acordo com a figura 17 é possível observar a alta produção de EROs geradas na presença de luz branca nas primeiras 6h de tratamento pelas moléculas: **3-TPyP > 4-PdTPyP > 4-PtTPyP > 3-PdTPyP > 4-TPyP > 3-PtTPyP**, enquanto que após 24h de incubação com os FS seguido do processo de irradiação observa-se que as moléculas que geram maior quantidade de EROs nas formas promastigotas de *Leishmania* foram a **3-TPyP > 3-PdTPyP > 3-PtTPyP**. Estes resultados sugerem que as porfirinas substituídas na posição *meso* são capazes de induzir uma maior produção de EROs a maiores tempos de incubação.

De acordo com Cocca, Tasso e colaboradores (2018) o aumento de atividade fotodinâmica de porfirinas tetra-catiônicas de Pt (II) nas posições *meso* e *para* está associado aos altos valores de rendimentos quânticos de triplete (Φ_T) e alta geração de oxigênio singlete (Φ_Δ). O oxigênio singlete é um produto das reações fotoquímicas do Tipo II e tem sido reportada como o principal agente responsável pela ação fotodinâmica de porfirinas

(Cocca et al., 2018; Xiong et al., 2019; Rossi et al., 2020). Isto poderia ser um dos motivos pelos quais, em algum dos casos, não se encontra uma direta associação entre o efeito anti-leishmanial reportado pelas porfirinas aqui testadas e a quantidade de EROs mensuradas em nossos ensaios. Como é o caso da molécula **3-PtTPyP** que apresentou a maior atividade fotodinâmica frente às formas promastigotas e amastigotas do parasita, mas demonstrou uma baixa indução na formação das EROs detectadas pela sonda H₂DCFDA. Sendo que possivelmente sua ação fotodinâmica esteja diretamente relacionada com a geração de oxigênio singlete.

Figura 17 - Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio utilizando 150 nM das porfirinas catiônicas tetra platinadas (**4-PtTPyP** e **3-PtTPyP**), tetra paladadas (**4-PdTPyP** e **3-PdTPyP**) e neutras (**3-TPyP**, **4-TPyP**) após 6h e 24h de incubação usando TFD na presença de luz branca (72 J/cm²). DMSO foi utilizado como controle. Os dados foram expressos como a média \pm DP. *: diferença estatisticamente significativa relativa ao controle ($P < 0,01$). α : diferença estatisticamente significativa entre os dois períodos de incubação ($P < 0,01$). Análise estatística foi determinada por ANOVA Two multiple comparisons test.



A presença de cargas positivas nas posições periféricas da porfirina incrementa o caráter anfífilo das moléculas o que está diretamente relacionado ao incremento das interações com as estruturas das membranas do parasita e conseqüentemente sua internalização e acumulação nos compartimentos subcelulares (DURANTINI; LAZZERI, 2003; ROSSI et al., 2020). Uma vez que o FS se difunde através das membranas celulares pode localizar-se em diferentes compartimentos como a mitocôndria, os lisossomos, e/ou o

retículo endoplasmático, entre outros (AL-QAHTANI et al., 2016; LINARES et al., 2020; MATEUS et al., 2014). A localização do fotodano em alvos subcelulares específicos é crítica para a ativação de vias de sinalização/regulação particulares e a magnitude e tipo de resposta celular, bem como quanto ao modo de morte celular após TFD (BENOV et al., 2015). As mitocôndrias são um alvo subcelular muito importante para muitos FS usados em TFD devido a tendência para induzir a célula a morte fotodinâmica por apoptose (MORGAN et al., 2001; CASTANO et al., 2004).

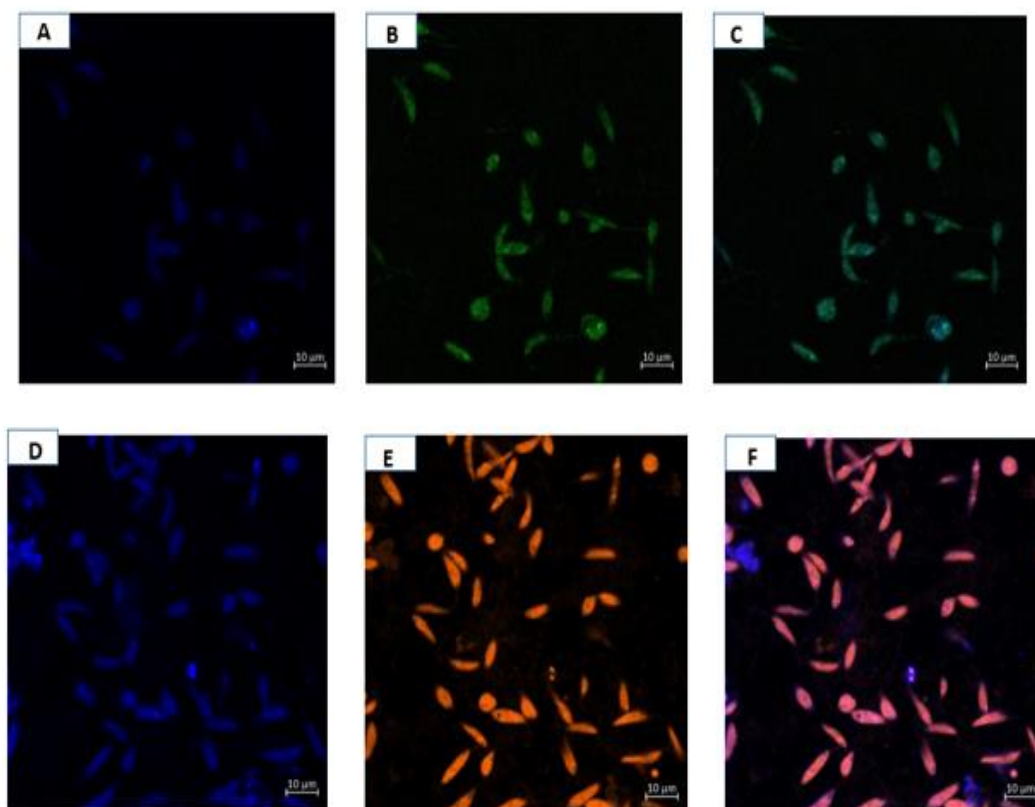
Tasso e colaboradores (2017) demonstraram que porfirinas catiônicas de platina *meso* substituídas e seus isômeros podem atingir diversos alvos intracelulares, como os lisossomos, as mitocôndrias e o núcleo, indistintamente das modificações realizadas as diferentes posições do anel piridil da porfirina. Adicionalmente, Andrade e colaboradores (2018) demonstraram que porfirinas de zinco em promastigotas e amastigotas de *L. brasiliensis* apresentam um maior efeito fotodinâmico que seus análogos livres de metal e isto é atribuído a um aumento das interações do FS com a membrana celular devido a presença do metal. Por tanto, análises da colocalização das porfirinas catiônicas de Pt (II) e Pd (II) *meso* substituídas, seus isômeros e seus análogos livres de metal (porfirinas neutras) foram realizados usando o marcador de mitocôndria MitoTracker™ Orange e o marcador de lisossomos LysoTracker™ Green como descrito em materiais e métodos.

Na Figura 18, observa-se que a porfirina tetra-catiônica **3-PtTPyP** (a qual vai ser utilizada como molécula representativa dos resultados obtidos com os FS aqui utilizados) foi capaz de permear a membrana plasmática de *Leishmania* desde que sua acumulação foi observada no citoplasma dos parasitas. Esta porfirina foi localizada tanto em compartimentos acídicos quanto na mitocôndria das formas promastigotas de *L. amazonensis* quando utilizado LysoTracker Green e MitoTracker Orange, respectivamente. Resultados similares foram obtidos com as demais porfirinas avaliadas (Material Suplementar, Figuras 23 a 24).

O tipo de morte celular induzido pela TFD depende das propriedades físico-químicas do FS, sua localização subcelular e concentração local, a concentração de oxigênio e o comprimento de onda e intensidade da luz usada para iluminação (BENOV et al., 2015). Em geral, FSs direcionados para a mitocôndria são associados com morte celular por apoptose, devido à disfunção mitocondrial, liberação de caspases e citocromo *c* (CASTANO et al., 2004; KESSEL; OLEINICK, 2018; MATEUS et al., 2014), enquanto que FSs com maior grau de agregação tendem a se localizar nos lisossomos ou compartimentos acídicos e induzir a morte

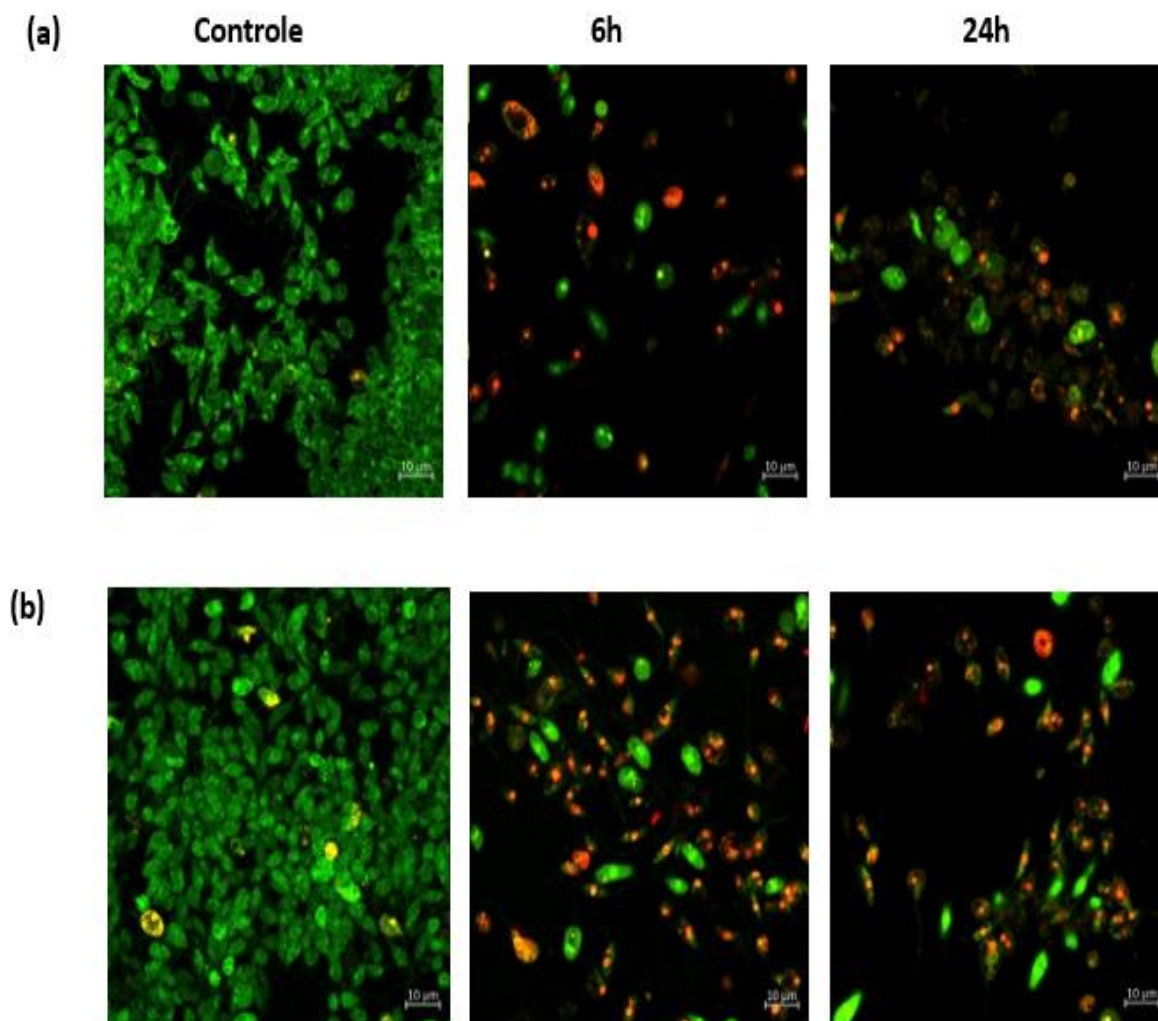
celular através da liberação de enzimas lisossômicas no citosol ou por realocização do FS após irradiação em outros compartimentos. Uma vez que o lisossomo se rompe e suas enzimas são liberadas a morte celular pode acontecer através do apoptose ou a necrose (CASTANO *et al.*, 2004; KESSEL; OLEINICK, 2018; LINARES *et al.*, 2020; NAGATA *et al.*, 2003; BENOVA *et al.*, 2015), pelo que a análises do tipo de morte celular potencialmente induzido por estas moléculas também foi avaliado utilizando a marcação com BE/LA como observa-se na figura 19.

Figura 18 - Localização celular em *Leishmania amazonensis* da porfirina 3-PtTPyP a 150 nM incubada por 24h e visualizada por microscopia confocal de fluorescência. **(A)** e **(D)** Colocalização de 3-PtTPyP (azul) detectada a 415-420 nm. **(B)** colocalização 3-PtTPyP com LysoTracker™ Green DND-26 (verde) detectado a 504/511 nm; **(E)** Co-localização de 3-PtTPyP (laranja) detectada a 415-420 nm com MitoTracker Orange™ CM-H₂TMROS detectado a 554/576 Nm. **(C)** e **(F)** (Merged) sobreposição de 3-PtTPyP com LysoTracker Green e de 3-PtTPyP MitoTracker Orange dentro dos parasitas (Merged) observa-se pelo sinal verde turquesa e rosa, respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor

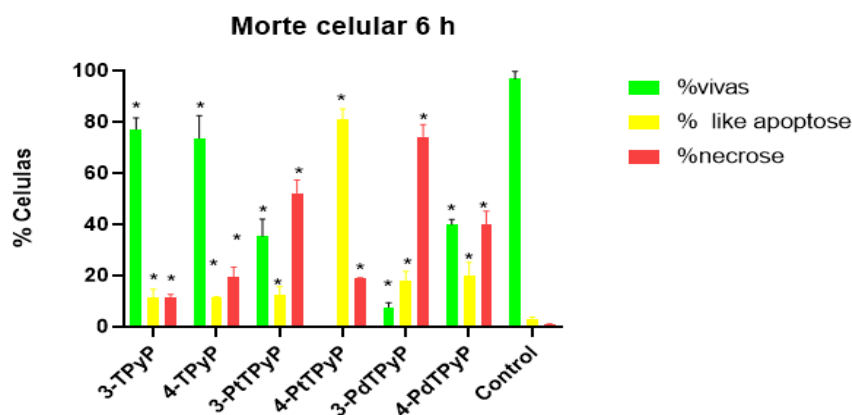
Figura 19- Mecanismo de morte celular potencialmente induzido pela porfirina (a) 3-PtTPyP e (b) 3PdTPyP associados a TFD frente a *Leishmania*. Imagens representativas de microscopia confocal de fluorescência de promastigotas de *L. amazonensis* marcadas com BE/LA após 6h e 24h de irradiação com a luz branca $72\text{J}/\text{cm}^2$ previamente incubadas com 150 nM de cada FSs. Promastigotas incubadas com (a) 3-PtTPyP e (b) 3PdTPyP que não passaram pelo processo de irradiação foram utilizadas como controle. Células viáveis encontram-se em verde, células em processo de apoptose – like em amarelo e necrose em vermelho laranjado.



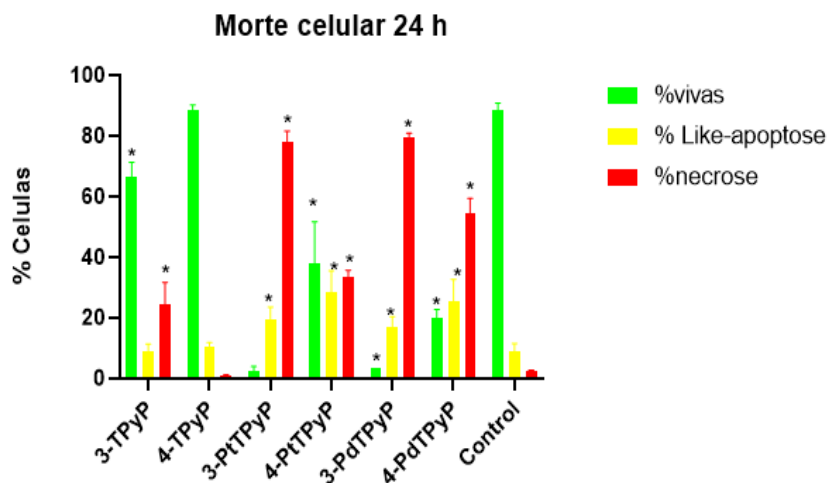
Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 20- Mecanismo de morte celular potencialmente induzido por derivados de porfirinas associados à TFD frente a *Leishmania amazonensis*. Porcentagem de células vivas, em processo de *like*-apoptose e/ou necrose após (a) 6h e (b) 24 h de incubação com os FSs (150 nM) seguidos do processo de irradiação com luz branca (72 J/cm²). Promastigotas na ausência dos FSs (presença e ausência de irradiação) foram utilizadas como controle. Os dados foram expressos como a média \pm DP. *: diferença estatisticamente significativa relativa ao controle ($P < 0,001$). A análise estatística foi determinada por ANOVA Two multiple comparisons test.

(a)



(b)



Como observado na Figura 20 as porfirinas **3-PdTPyP** e **3-PtTPyP** acarretam a morte dos parasitas principalmente por necrose enquanto que seus isômeros *para* apresentaram os dois tipos de morte celular (*Like*-apoptose e/ou necrose). Nas primeiras 6h de tratamento as moléculas **3-PtTPyP** e **3-PdTPyP** na presença de luz branca induziram a morte do parasita principalmente por necrose (52,2 % e 74,2 %, respectivamente). Enquanto que a molécula **4-PtTPyP** induz a morte das promastigotas, principalmente, por *like*-apoptose (81%). Do

mesmo modo, após 24 h de incubação com os FSs encontrou-se que ambas as moléculas **3-PtTPyP** e **3-PdTPyP** apresentaram o mesmo tipo de mecanismo de morte induzido (necrose) após 6h de irradiação sobre os parasitas (78% e 79% respectivamente). Por outro lado, após 24 h, a molécula **4-PtTPyP** induz a morte do parasita tanto por necrose quanto por like-apoptose, numa proporção de 33,6% e 28,2%, respectivamente, mostrando que neste caso, o tempo de incubação pode ser determinante para o tipo de morte celular potencialmente induzido pelo FS. Já o isômero **4-PdTPyP** em ambos os tempos (6h e 24h) levou o parasita na presença de luz branca à morte principalmente por necrose (40%., nas primeiras 6h e 54,5 % após 24h), sendo mais notório seu efeito após 24h de irradiação.

Em geral, observa-se que o tipo de morte celular preferencialmente induzido por estes FSs após TFD é majoritariamente necrose. A necrose pode desempenhar um papel essencial na depuração do tecido, estimulando a resposta imune inata (GUERRIERO *et al.*, 2008; LINARES *et al.*, 2020), o que pode contribuir no tratamento da LC.

Por outro lado, **3-TPyP** mostrou-se como a molécula com maior capacidade de induzir a produção de EROs no parasita na presença de luz branca (Figura 17), contudo, a geração de EROs nas primeiras 24h parece não ter nenhum efeito no potencial anti-leishmanial observado nos ensaios biológicos (avaliados 48h após irradiação). Isto mostra que não necessariamente a produção de EROs é diretamente proporcional ao efeito fototóxico do FS e sim, provavelmente, está relacionado com uma maior afinidade do FS pelas membranas e, por tanto, a uma maior captação e acumulação do FS ao interior do parasita.

A distribuição de carga e a lipofilicidade de uma molécula estão entre os parâmetros mais importantes que controlam a captação celular e a distribuição subcelular (BRISTOW *et al.*, 2006; EZZEDDINE *et al.*, 2013; TASSO *et al.*, 2017; IMRAM *et al.*, 2018). Segundo TASSO *et al.* (2017) as porfirinas *meso* substituídas, como é o caso das porfirinas **3-PtTPyP** e **3-PdTPyP**, apresentam maior afinidade de ligação pelas membranas que seus isômeros *para*. A baixa simetria do anel piridil *meso* substituído pelos metais Pt (II) e Pd(II) pode conferir uma distribuição espacial de cargas que resulta numa maior polaridade e, conseqüentemente, maior anfifilicidade em relação a seus isômeros 4 permitindo assim uma melhor interação com os fosfolipídios da membrana o que poderia estar relacionado com um aumento de sua ação fotodinâmica e, por tanto, maior indução dos parasitas ao processo de morte celular.

Estes resultados sugerem que a eficácia da TFD deste tipo de porfirinas tetra-catiônicas depende da carga da molécula, sua lipofilicidade, sua afinidade pelas membranas do parasita e também, da sua localização subcelular, já que cada compartimento celular tem uma sensibilidade variada segundo as espécies reactivas foto-generadas pelo FS (BENOV et al., 2015). Como consequência, a distribuição subcelular da porfirina é um forte preditor de sua eficácia fotodinâmica.

6.0 CONCLUSÕES

Das oito porfirinas estudadas neste trabalho as porfirinas com a substituição da posição 3 meso 3-PtTPyP, 3-PdTPyP e 3-TPyP, foram as que mais tiveram melhores resultados sobre o efeito fototóxico contra as promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* na presença de luz branca.

Em relação a seletividade das moléculas as porfirinas 3-PtTPyP > 3-PdTPyP = 3-TPyP > 4-PdTPyP

As porfirinas 3-PtTPyP ,3-PdTPyP desencadearam morte celular das promastigotas por necrose.

A porfirina 3-TPyP teve alta produção de EROs mas apresentou em 6h apenas (11,5% de necrose e 11,2 % de apoptose) e em 24h (24,4 %de necrose e 9,1 %de apoptose). Por não apresentar metais de transição em sua molécula a porfirina neutra não teve maior interação com a membrana do parasita como apresentaram as porfirinas 3-PtTpYp e 3-PdTPyP.

Seria interessante investigar a produção de oxigênio singlete que pode ser outro mecanismo responsável pela morte celular visto que as EROs não coincidiram com a da morte celular dos parasitas. Pois a TFD possui dois tipos de mecanismo tipo 1 e tipo 2 que geram a morte dos parasitas.

Assim, estes dados sugerem que a TFD mediada por porfirinas tetracationicas *meso* substituídas por metais, como porfirinas tetracatiônicas meta Pt (II) e Pd (II) são ótimas candidatas para atividade leishmanicida e para estudos futuros de *in vivo*.

7.0 REFERÊNCIAS

ACKROYD, R. et al. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656, 2001.

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

AL-QAHTANI, A. et al. Aminophthalocyanine-mediated photodynamic inactivation of *Leishmania tropica*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2003–2011, 2016.

ALLEGRA, A. et al. Oxidative stress and photodynamic therapy of skin cancers: Mechanisms, challenges and promising developments. **Antioxidants**, v. 9, n. 5, p. 1–20, 2020.

AN, M. M. et al. Allicin enhances the oxidative damage effect of amphotericin B against *Candida albicans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 3, p. 258–263, 2009.

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

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. p. 175–196, 2012.

BARROS-ALVAREZ, Ximena et al. Glycosomal targets for anti-trypanosomatid drug discovery. **Current medicinal chemistry**, v. 21, n. 15, p. 1679-1706, 2014.

BASSO, G. et al. Photodynamic inactivation of selected bovine viruses by isomeric cationic tetra-platinated porphyrins. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 23, n. 9, p. 1041–1046, 2019.

BASTOS, M. 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.

BELLNIER, D. A. et al. Clinical pharmacokinetics of the PDT photosensitizers porfimer sodium (Photofrin), 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a (Photochlor) and 5-ALA-induced protoporphyrin IX. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 38, n. 5, p. 439–444, 2006.

BENOV LT. Effect of molecular characteristics on cellular uptake, subcellular localization, and phototoxicity of Zn(II) N-alkylpyridylporphyrins. **J Biol Chem**. 2013 Dec 20;288(51):36579-88. doi: 10.1074/jbc.M113.511642. Epub 2013 Nov 8. PMID: 24214973; PMCID: PMC3868770

BOLLINI, M.; CASAL, J. J.; ALVAREZ, D. E.; BOIANI, L.; GONZÁLEZ, M.; CERECETTO, H.; BRUNO, A. M. New potent imidazoisoquinolinone derivatives as anti-*Trypanosoma cruzi* agents: biological evaluation and structure-activity relationships. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 4, p. 1437-1444, 2009

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, v. 392, n. 10151, p. 951–970, 2018.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1776, n. 1, p. 86–107, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar. 1ª edição, versão eletrônica, 2017. Brasília. DF. Brasil. Acessado em 17/08/2022 disponível em:http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf

BRASIL. Ministério da Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral 2014. Brasília. DF. Brasil. Acessado em 17/08/2022. Disponível em: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visce ral_1edicao.pdf.

BRISTOW CA, HUDSON R, PAGET TA, BOYLE RW. Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. 2006 Sep;3(3):162-167. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2006.04.004. PMID: 25049150.

CABRAL, F. V. et al. Towards effective cutaneous leishmaniasis treatment with light-based technologies. A systematic review and meta-analysis of preclinical studies. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 221, n. May, 2021.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.

CHATTOPADHYAY, A.; JAFURULLA, M. A novel mechanism for an old drug: Amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 416, n. 1–2, p. 7–12, 2011.

CLÁUDIA, M.; ISSA, A.; MANELA-AZULAY, M. Photodynamic therapy: a review of the literature and image documentation Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 4, p. 501–512, 2010.

COCCA, L. H. Z. et al. Investigation of excited singlet state absorption and intersystem crossing mechanism of isomeric meso-tetra(pyridyl)porphyrins containing peripheral polypyridyl platinum(II) complexes. **Chemical Physics Letters**, v. 708, n. Ii, p. 1–10, 2018.

COCCA, L. H. Z. et al. Excited-state investigations of meso-mono-substituted-(amino-ferrocenyl)porphyrins: Experimental and theoretical approaches. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 384, n. August, p. 112048, 2019.

DABROWSKI, J.; PUCELIK, B.; REGIEL-FUTYRA, A.; BRINDELL, M.; MAZURYK, O.; KYZIOL, A.; STOCHEL, G.; MACYK, W.; ARNAUT, L. Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 325, p. 67-101, 2017

DĄBROWSKI, J. M.; ARNAUT, L. G. Photodynamic therapy (PDT) of cancer: From local to systemic treatment. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 14, n. 10, p. 1765–

1780, 2015.

DAI, T. et al. Photodynamic therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection in a mouse skin abrasion model. **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 42, n. 1, p. 38–44, 2010.

DNDi Drugs for neglected diseases initiative 2022, Novas recomendações para o tratamento das leishmanioses nas Américas, Disponível: <https://www.dndial.org/2022/comunicacao-e-informacao/novas-recomendacoes-para-o-tratamento-das-leishmanioses-nas-americas>

DURANTINI, E.; LAZZERI, D. Synthesis of meso -substituted cationic porphyrins as potential photodynamic agents. n. April, 2003.

ECHEVARRIA, J. et al. Oral rehydration solution to prevent nephrotoxicity of amphotericin B. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 6, p. 1108–1112, 2006.

EZZEDDINE, R. Effect of molecular characteristics on cellular uptake, subcellular localization, and phototoxicity of Zn (II) N-alkylpyridylporphyrins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 51, p. 36579–36588, 2013.

FARIA, D. R. et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 7853–7859, 2005.

FERREIRA, J. et al. Islands of surviving cells within necrotic volume at liver induced by PDT. **Photodynamic Therapy: Back to the Future**, v. 7380, p. 73803S, 2009.

FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

GANTT, K. R. et al. Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 2, p. 893–901, 2001.

GARDNER, D. M. et al. Association of acenaphthoporphyrins with liposomes for the photodynamic treatment of leishmaniasis. **Photochemistry and Photobiology**, v. 86, n. 3, p. 645–652, 2010.

G. BASSO, J. F.; CARGNELUTTI, A. L.; OLIVEIRA, T. V.; ACUNHA, R.; WEIBLEN, E. F.; FLORES, B. A. IGLESIAS, Photodynamic inactivation of selected bovine viruses by isomeric cationic tetra-platinated porphyrins, **J. Porphyr. Phthalocyanines** 23 (2019) 1041–1046.

GHOSH, S.; GOSWAMI, S.; ADHYA, S. Role of superoxide dismutase in survival of *Leishmania* within the macrophage. **Biochemical Journal**, v. 369, n. 3, p. 447–452, 2003.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: Implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. 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.

GSPONER, N. S.; SPESIA, M. B.; DURANTINI, E. N. Effects of divalent cations, EDTA and chitosan on the uptake and photoinactivation of *Escherichia coli* mediated by cationic and anionic porphyrins. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 1, p. 67–75, 2015.

GUERRIERO, J. L. et al. Chemotherapy Induces Tumor Clearance Independent of Apoptosis. n. 23, p. 631–632, 2008.

GUTERRES, K. B. et al. Metal center ion effects on photoinactivating rapidly growing mycobacteria using water-soluble tetra-cationic porphyrins. **BioMetals**, v. 33, n. 4–5, p. 269–282, 2020.

HAMILL, R. J. Amphotericin B Formulations: A Comparative Review of Efficacy and Toxicity. p. 919–934, 2013.

HERWALDT BL. Leishmaniasis. *Lancet*. 1999 Oct 2;354(9185):1191-9. doi: 10.1016/S0140-6736(98)10178-2. PMID: 10513726.

HENDRICKX, S.; CALJON, G.; MAES, L. Need for sustainable approaches in antileishmanial drug discovery. p. 2743–2752, 2019.

IMRAN, M., RAMZAN, M., QURESHI, A., KHAN, M., & TARIQ, M. (2018). Emerging Applications of Porphyrins and Metalloporphyrins in Biomedicine and Diagnostic Magnetic Resonance Imaging. **Biosensors**, 8(4), 95. doi:10.3390/bios8040095

JOSEFSEN, L. B.; BOYLE, R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. **Metal-Based Drugs**, v. 2008, 2008.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KEMPA, M. et al. Physicochemical properties of potential porphyrin photosensitizers for photodynamic therapy. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 146, p. 249–254, 2015.

Kessel D, Oleinick NL. Cell Death Pathways Associated with Photodynamic Therapy: An Update. *Photochem Photobiol*. 2018 Mar;94(2):213-218. doi: 10.1111/php.12857. Epub 2018 Jan 16. PMID: 29143339.

KHOURI, R. et al. DETC induces *Leishmania* parasite killing in human invitro and murine in vivo models: A promising therapeutic alternative in leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 8–9, 2010.

KIP, A. E. et al. Clinical Pharmacokinetics of Systemically Administered Antileishmanial Drugs. **Clinical Pharmacokinetics**, v. 57, n. 2, p. 151–176, 2018.

KORNHUBER, J. et al. Lipophilic cationic drugs increase the permeability of lysosomal membranes in a cell culture system. **Journal of Cellular Physiology**, v. 224, n. 1, p. 152–164, 2010.

LAULETTA, J. A.; CUNHA, M. A.; QUEIROZ, I. T. Leishmaniasis – HIV coinfection : current challenges. p. 147–156, 2016.

LEE, S. et al. Dual-channel imaging system for singlet oxygen and photosensitizer for PDT. **Biomedical Optics Express**, v. 2, n. 5, p. 1233, 2011.

LINDOSO, J. A. L. et al. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, n. 12, p. 69–77, 2012.

LINARES, I. A. P. et al. Antileishmanial activity of amphiphilic chlorin derivatives mediated by photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, n. April, p. 101769, 2020.

LOPERA, A. A. et al. Solution-combustion synthesis of doped TiO₂ compounds and its potential antileishmanial activity mediated by photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 183, n. November 2017, p. 64–74, 2018.

MACCORMACK, M. A. Photodynamic Therapy in Dermatology: An Update on Applications and Outcomes. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 27, n. 1, p. 52–62, 2008.

MACHADO AE. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. *Quim Nova*. 2000;23:237-243

MANN, S. et al. A Review of Leishmaniasis: Current Knowledge and Future Directions. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 8, n. 2, p. 121–132, 2021.

MANZANO, J. I. et al. Uptake of the antileishmania drug tafenoquine follows a sterol-dependent diffusion process in Leishmania. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 11, p. 2562–2565, 2011.

MATOS, A. P. S. et al. A review of current treatments strategies based on paromomycin for leishmaniasis. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 57, 2020. doi: 10.1016/j.jddst.2020.101664.

MATEUS, J. E. et al. Cell accumulation and antileishmanial effect of exogenous and endogenous protoporphyrin IX after photodynamic treatment. **Biomedica**, v. 34, n. 4, p. 589–597, 2014.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MOGHNIE, S. et al. Cationic amphiphilic Zn-porphyrin with high antifungal photodynamic potency. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 16, n. 11, p. 1709–1716, 2017.

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

MONZOTE, L. Current treatment of leishmaniasis: a review. **Open Antimicrob Agents J**, v. 1, n. August, p. 9–19, 2009.

NAGATA, S. et al. Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells

following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na). **Lasers in Surgery and Medicine**, v. 33, n. 1, p. 64–70, 2003.

NATHAN, C.; SHILOH, M. U. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 16, p. 8841–8848, 2000.

NO, J. H. Visceral leishmaniasis: Revisiting current treatments and approaches for future discoveries. **Acta Tropica**, v. 155, p. 113–123, 2016.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: Drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 4–5, p. 257–266, 2004.

OLÍAS-MOLERO, A. I. et al. Antileishmanial drug discovery and development: Time to reset the model?. **Microorganisms**, v. 9, n. 12, 1 dez. 2021.

PANDEY, R. K. et al. Chlorin and Porphyrin Derivatives As Potential Photosensitizers in Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 53, n. 1, p. 65–72, 1991.

PASSALACQUA, T. G. et al. Synthesis and evaluation of novel prenylated chalcone derivatives as anti-leishmanial and anti-trypanosomal compounds. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 16, p. 3342–3345, 3 jul. 2015.

PASSERINI, G. D; **Avaliação do potencial tripanocida de substâncias extraídas da Família Piperaceae em formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*** Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista ARARAQUARA 2008

PURKAIT, B. et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 1031–1041, 2012.

RODRIGUES DA SILVA, E. et al. Terapia fotodinâmica no tratamento do câncer de pele: conceitos, utilizações e limitações Photodynamic therapy in the skin cancer treatment: concepts, utilizations and limitations. **Rev. Bras. Farm**, v. 90, n. 3, p. 211–217, 2009.

ROSSI, G. G. et al. Peripheral tetra-cationic Pt(II) porphyrins photo-inactivating rapidly growing mycobacteria: First application in mycobacteriology. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, n. April, p. 104455, 2020.

SANTIAGO, A. S.; PITA, S. S. DA R.; GUIMARÃES, E. T. Tratamento da leishmaniose, limitações da terapêutica atual e a necessidade de novas alternativas: Uma revisão narrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e29510716543, 2021.

SEIFERT, K. Structures, Targets and Recent Approaches in Anti-Leishmanial Drug Discovery and Development. **The Open Medicinal Chemistry Journal**, v. 5, p. 31–39, 2011.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p.

485–497, 2012.

SOARES LOPES, L. Q. et al. Antimicrobial activity and safety applications of meso-tetra(4-pyridyl)platinum(II) porphyrin. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, n. June 2018, p. 47–54, 2019.

STUART, K. et al. Review series Kinetoplastids : related protozoan pathogens , different diseases. v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008.

TASSO, T. Isomeric effect on the properties of tetraplatinated porphyrins showing optimized phototoxicity for photodynamic therapy. **Dalton Transactions**, v. 46, n. 33, p. 11037-11045, 2017

TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; NETO, C. F. Terapia fotodinâmica em dermatologia: Princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, n. 5, p. 445–459, 2009.

VAN ASSCHE, T. et al. Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337–351, 2011a.

VAN ASSCHE, T. et al. Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337–351, 2011b.

VARLAM, D. E. et al. Apoptosis Contributes to Amphotericin B- Induced Nephrotoxicity. v. 45, n. 3, p. 679–685, 2001.

VARZANDEH, M. et al. Photodynamic therapy for leishmaniasis: Recent advances and future trends. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 36, n. August, p. 102609, 2021.

VELÁSQUEZ, A. M. A, Antiprotozoal activity of the cyclopalladated complexes against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 1032-1039, 2016.

VELASQUEZ, A. M. A. **Do screening ao mecanismo de ação, uma contribuição para a descoberta de ciclopaladados bioativos: a atividade leishmanicida de CP2 e seu efeito inibitório frente à DNA topoisomerase 1B de Leishmania**. p. 131, 2017. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Instituto de Química de Araraquara, São Paulo.

VELASQUEZ, A. M. A, New insights into the mechanism of action of the cyclopalladated complex - CP2 in *Leishmania*: Calcium Dysregulation, Mitochondrial Dysfunction and Cell Death. **Antimicrob Agents Chemother**, Jan 18;66(1):e0076721. 2022.

VITAL-FUJII, D. G.; BAPTISTA, M. S. Progress in the photodynamic therapy treatment of leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 54, n. 12, p. 1–11, 2021.

WORLD Health Organization, 2022, Control of leishmaniasis, Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1.

WILSON, M. E.; ANDERSEN, K. A.; BRITIGAN, B. E. Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 11, p. 5133–5141, 1994.

XIONG, Y.; TIAN, X.; AI, H. W. Molecular tools to generate reactive oxygen species in biological systems. **Bioconjugate Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 1297–1303, 2019.

YOON, I.; LI, J. Z.; SHIM, Y. K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. **Clinical Endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 7–23, 2013.

ZHOU, Z. et al. Advances in photosensitizer-related design for photodynamic therapy. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 6, p. 668–686, 2021.

APÊNDICE 1

EROs

Figura 21- Avaliação da geração de espécies reativas de oxigênio utilizando 150 nM das porfirinas catiônicas tetra platinadas (**4-PtTPyP** e **3-PtTPyP**) paládio (**4-PdTPyP** e **3-PdTPyP**) e neutras (**3-TPyP**, **4-TPyP**), após 6h e 24h de incubação usando TFD na ausência de luz branca (72 J/cm²). DMSO foi utilizado como controle. Os dados foram expressos como a média \pm DP. *: diferença estatisticamente significativa relativa ao controle ($P < 0,01$). α : diferença estatisticamente significativa entre os dois períodos de incubação ($P < 0,01$). Análise estatística foi determinada por ANOVA Two multiple comparisons test.

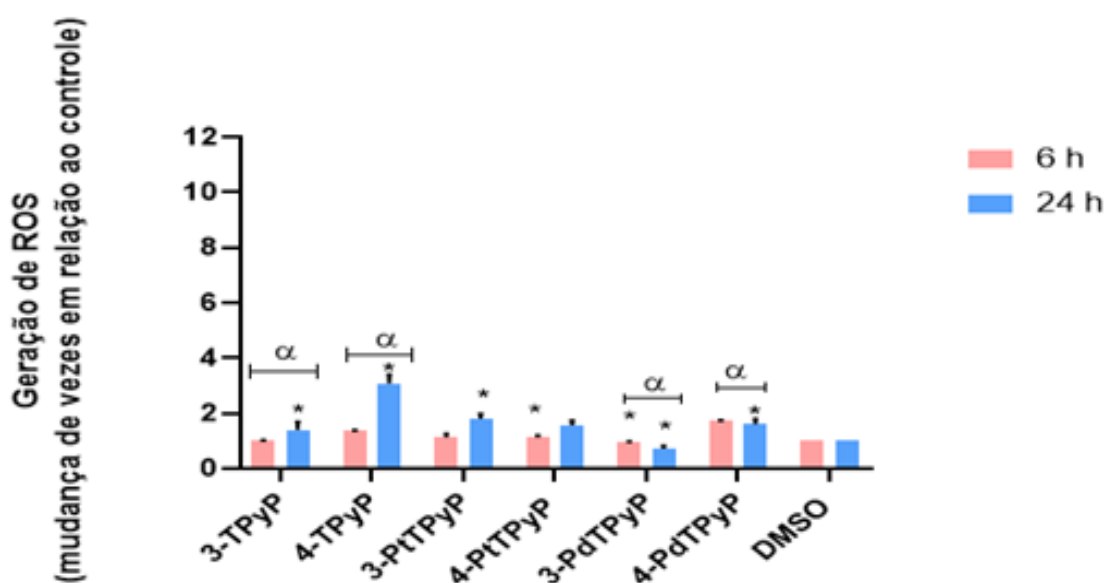
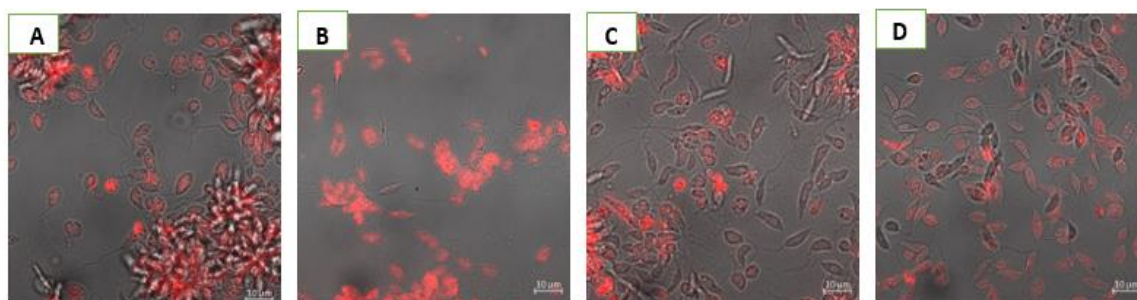


Figura 22 Avaliação da acumulação de Porfirinas em promastigotas de *L. amazonensis*



COLOCALIZAÇÃO

Figura 23- Localização celular em *Leishmania amazonensis* da porfirina 3-PdTPyP a 150 nM incubada por 24h e visualizada por microscopia confocal de fluorescência. **(G)** e **(J)** Colocalização de 3-PdTPyP (azul) detectada a 415-420 nm. **(H)** colocalização 3-PdTPyP com LysoTracker™ Green DND-26 (verde) detectado a 504/511 nm; **(k)** Co-localização de 3-PdTPyP (laranja) detectada a 415-420 nm com MitoTracker Orange™ CM-H₂TMROS detectado a 554/576 nm **(I)** e **(L)** 3-PdTPyP com LysoTracker Green e MitoTracker Orange dentro dos parasitas (Merged) observa-se pelo sinal verde turquesa e rosa, respectivamente.

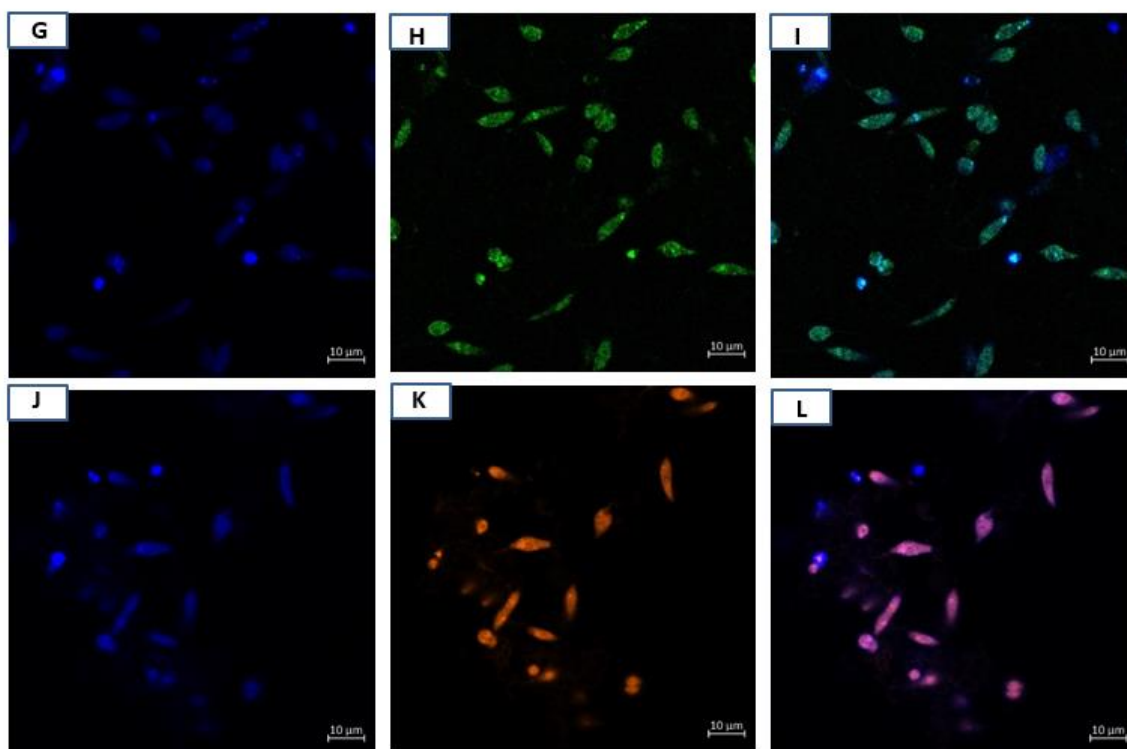


Figura 24- - Localização celular em *Leishmania amazonensis* da porfirina 3-TPyP a 150 nM incubada por 24h e visualizada por microscopia confocal de fluorescência. **(M)** e **(P)** Colocalização de 3-TPyP (azul) detectada a 415-420 nm. **(N)** colocalização 3-TPyP com LysoTracker™ Green DND-26 (verde) detectado a 504/511 nM; **(Q)** Co-localização de 3-TPyP (laranja) detectada a 415-420 nm com MitoTracker Orange™ CM-H₂TMROS detectado a 554/576 nM **(O)** e **(R)** 3-TPyP com LysoTracker Green e MitoTracker Orange dentro dos parasitas (Merged) observa-se pelo sinal verde turquesa e rosa, respectivamente.

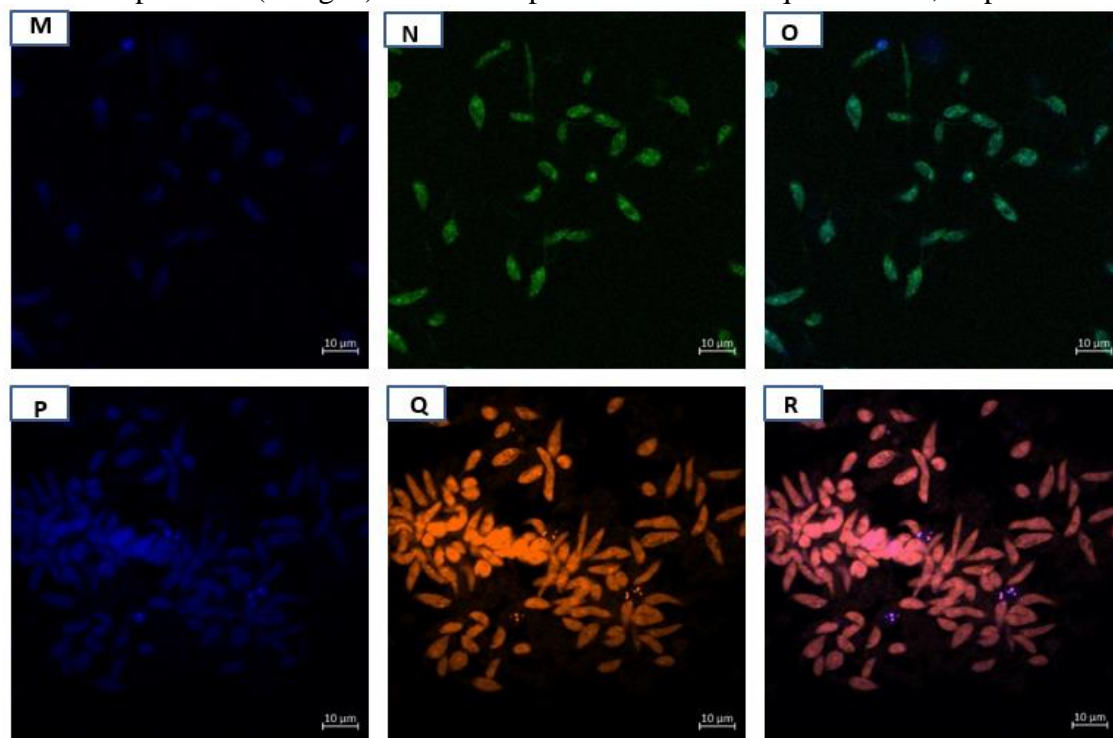


Figura 25 - Mecanismo de morte celular potencialmente induzido pela porfirina (a) 4-TPyP e (b) 3-TPyP associadas a TFD frente a *Leishmania*. Imagens representativas de microscopia confocal de fluorescência de promastigotas de *L. amazonensis* marcadas com BE/LA após 6h e 24h de irradiação com a luz branca $72\text{J}/\text{cm}^2$ previamente incubadas com 150 nM de cada FSs. Promastigotas incubadas com (a) 4-TPyP e (b) 3-TPyP que não passaram pelo processo de irradiação foram utilizadas como controle. Células viáveis encontram-se em verde, células em processo de apoptose – like em amarelo e necrose em vermelho laranjado.

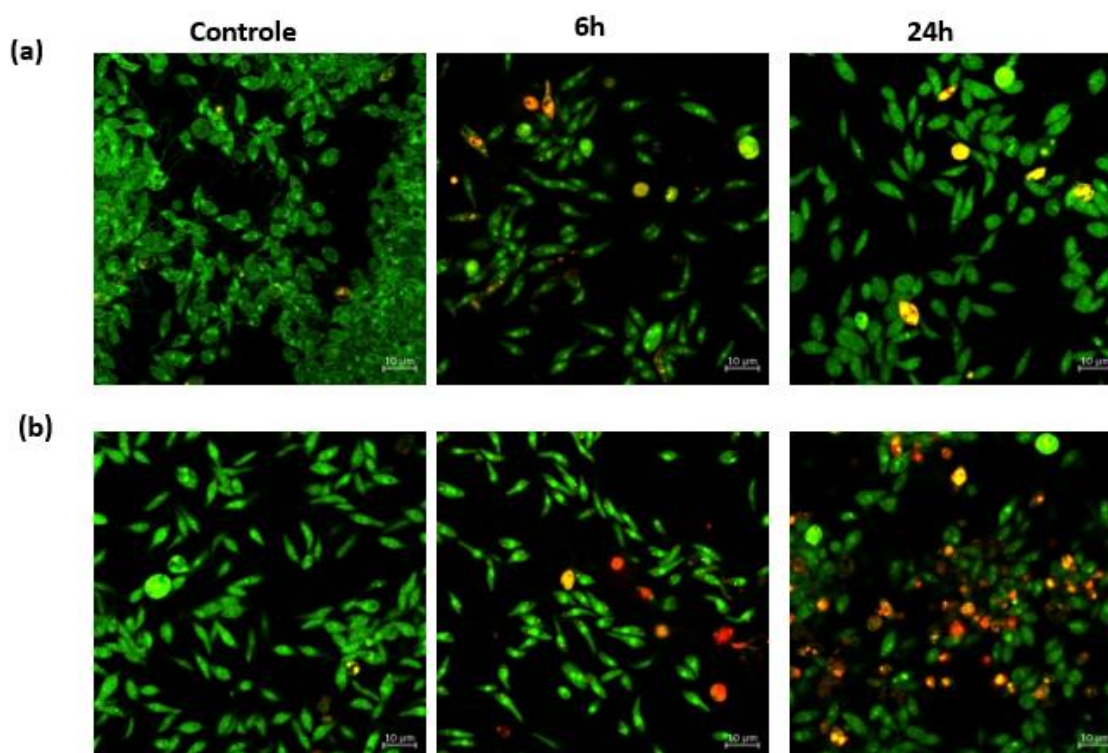
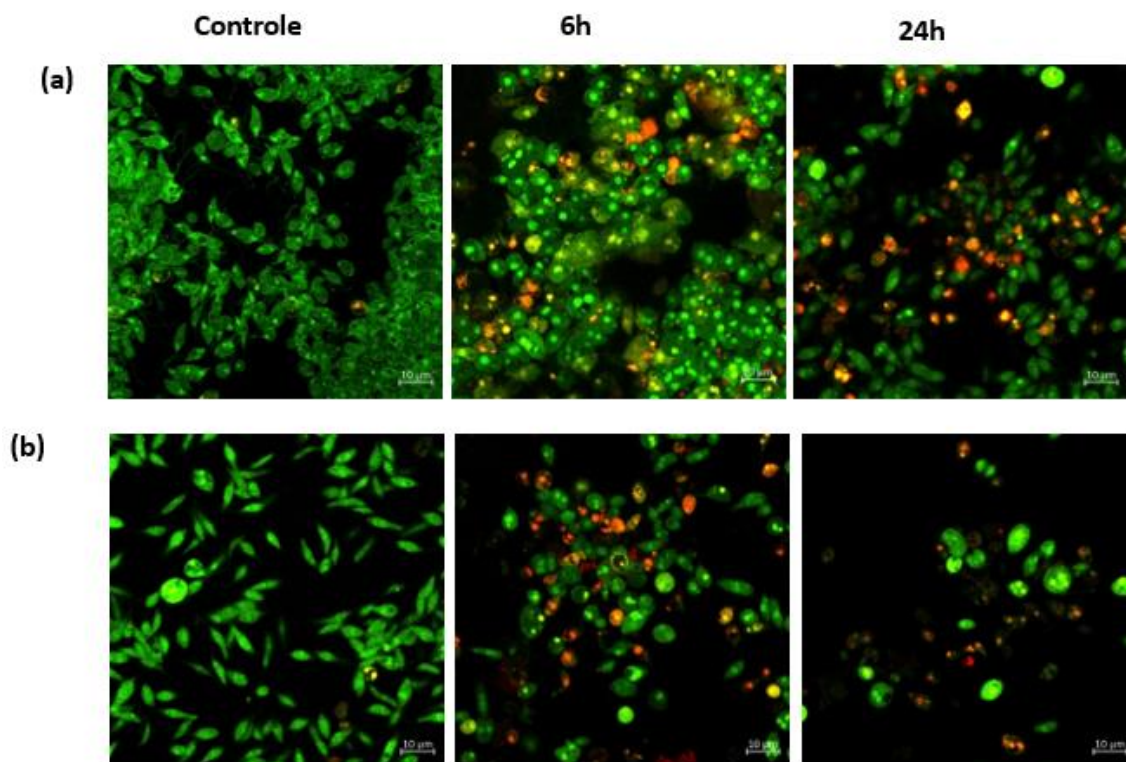


Figura 26 - Mecanismo de morte celular potencialmente induzido pela porfirina (a) 4-PtTPyP e (b) 4-PdTPyP associadas a TFD frente a *Leishmania*. Imagens representativas de microscopia confocal de fluorescência de promastigotas de *L. amazonensis* marcadas com BE/LA após 6h e 24h de irradiação com a luz branca $72\text{J}/\text{cm}^2$ previamente incubadas com 150 nM de cada FSS. Promastigotas incubadas com (a) 4- PtTPyP e (b) 4-PdTPyP que não passaram pelo processo de irradiação foram utilizadas como controle. Células viáveis encontram-se em verde, células em processo de apoptose – like em amarelo e necrose em vermelho laranjado.





Protocolo CEUA/FCF/CAR nº 11/2021

Interessada: Maricely Sánchez Uría

Título do projeto: Avaliação anti-leishmanial da atividade in vitro de chalconas em *Leishmania(L.) infantum* e atividade fototóxica de porfirinas frente a *Leishmania amazonensis* usando a terapiafotodinâmica para a verificação da citotoxicidade em macrófagos de camundongos Swiss

Parecer nº 24/2022 – Comissão de Ética no Uso de Animais

A Comissão de Ética no Uso de Animais desta Faculdade, reunida em 07 de outubro de 2022, analisou o relatório final do protocolo para uso de animais na pesquisa: "Avaliação anti-leishmanial da atividade in vitro de chalconas em *Leishmania(L.) infantum* e atividade fototóxica de porfirinas frente a *Leishmania amazonensis* usando a terapiafotodinâmica para a verificação da citotoxicidade em macrófagos de camundongos Swiss", apresentado pela pesquisadora Maricely Sánchez Uría, e considerou o referido relatório estruturado dentro dos princípios éticos na experimentação animal do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, manifestando-se FAVORÁVEL à sua aprovação.

Araraquara, 14 de outubro de 2022.

Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros Coordenadora da CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação anti-leishmanial da atividade in vitro de chalconas em Leishmania (L.) infantum e atividade fototóxica de porfirinas frente a Leishmania amazonensis usando a terapia fotodinâmica para a verificação da citotoxicidade em macrófagos de camundongos Swiss**”, registrada com o Protocolo CEUA/FCF/CAR: 11/2021, sob a responsabilidade da pesquisadora Maricely Sánchez Uría, que envolve a produção, manutenção 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 “ad referendum” pelo Vice-coordenador da COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS da Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Campus de Araraquara da UNESP no dia 16 de setembro de 2022.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Outubro de 2022
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico BALB/c
Nº de animais	35
Peso/Idade	21g / 5-6 semanas
Sexo	Machos
Origem	1- Área de Expedição de Animais CEMIB/UNICAMP. Campinas - SP 2- Biotério USP. Ribeirão Preto - SP.
Registro CIAEP	02.00082.2019

Araraquara, 16 de setembro de 2022.

Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani Vice-coorden